

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR



Digitized by the Internet Archive
in 2024

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : **P. LÉPINE**

TOME SOIXANTE-DIX-HUITIÈME

Janvier-Juin 1950

QR

1

A475

v.78

Jan.-June

1950

PER

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

PARIS. — ANC. IMP. DE LA COUR D'APPEL, 4, RUE CASSETTE. — 1950

T. 78

JANVIER 1950

N° 1

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE



MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

SOMMAIRE DU N° 1

	Pages
Formation et propriétés de la fonction-anticorps correspondant aux molécules organiques de faible poids moléculaire, par J. LOISELEUR (avec l'assistance de M ^{me} M. SAUVAGE).	1
De l'amylose d' <i>Escherichia coli</i> , par JACQUES MONOD et ANNE-MARIE TORRIANI	1
La survie du bacille typhique VI et de son bactériophage dans l'eau, par A. GUELIN	1
Etude de quelques substances dérivées de terpènes, capables d'accroître la sensibilité des révélateurs de réagines syphilitiques (le camphène, l'isobornéol, le thymol, le menthol), par L. SAINT-PRIX et S. MUTERMILCH	1
Contribution à l'étude des propriétés biologiques des acides gras ramifiés. — I. Sur les propriétés toxiques de quelques acides ramifiés non saturés, par A. SARTORY, JACQUES MEYER et PAUL CAGNANT	1
L'emploi de la gélose au jaune d'œuf pour la mise en évidence des bacilles tuberculeux résistants à la streptomycine ou à l'acide para-aminosalicylique, par ALFRED G. KARLSON, ANDRÉ-M. DELAUNE et GÉRALD M. NEEDHAM	1
Sur le mécanisme de l'action de la streptomycine. — II. La résistance à la streptomycine, par ROGER LINZ	1
Le mécanisme enzymatique de la réaction de désamination couplée chez les bactéries anaérobies strictes du groupe <i>Cl. sporogenes</i> , par B. NISMAN et G. VINET	1
Société française de microbiologie (<i>Sommaire page 4 de la couverture</i>)	1

Œuvres de Pasteur réunies par PASTEUR VALLERY-RADOT, tome VII « Mélanges scientifiques et littéraires. Index analytique de l'œuvre de Pasteur ». Un volume in-8° de 666 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.

Albert Calmette. Sa vie. Son œuvre scientifique, par P. NOËL BERNARD et LÉOPOLD NÉGRE. *Préface de Pasteur Vallery-Radot. Avant-propos de A. Yersin*. Un vol. de 274 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.

J. BORDET. — *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses*. Deuxième édition. Un volume de 880 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.

ANDRÉ-R. PRÉVOT. — *Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies*. Un volume in-8° de 290 pages, 2^e édition (*Monographie de l'Institut Pasteur*), Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1948.

MARGUERITE LWOFF. — *Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagelles trypanosomides*. Un vol. de 244 pages (*Monographie de l'Institut Pasteur*), Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1941.

EDM. SERGENT, A. DONATIEN, L. PARROT et F. LESTOQUARD (*in memoriam*). — **Etude sur les piroplasmoses bovines**. Un vol. in-16 de 816 pages, 325 illustrations, 1945 (*Institut Pasteur, Alger*).

N. B. — *Le paiement est accepté en toutes monnaies étrangères au cours du dollar au moment du règlement*

PRIX DE L'ABONNEMENT POUR 1950

France et Union Française	Fr. 2.000
(Règlement par mandat, chèques postaux (<i>Compte n° 599 Paris</i>) ou chèque bancaire.)	
Belgique et Luxembourg	Fr. B. 375
Autres pays	\$ U. S. A. 7,50
Prix également payables dans les autres monnaies au cours des règlements commerciaux le jour du paiement.	
(Règlement par Banque Nationale.)	
Changement d'adresse : 20 fr.	

Secrétariat, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (XV^e).

Publication mensuelle.

NOUVELLE CHIMIOTHÉRAPIE

DES

**TRYPARASOMIASES
ET LEISHMANIOSES**

LOMIDINE

(DIMÉTHANESULFONATE DE P-P' DIAMIDINO-1,5-DIPHÉNOXY-PENTANE)

AMPOULES DE 5 CM³

DE SOLUTION CONTENANT 125 mg DE BASE

(BOITES DE 5)

TRAITEMENT
DES
MYÉLOMES MULTIPLES

ÉCHANTILLONS ET LITTÉRATURE SUR DEMANDE



R. LEQUEUX (Anc. Maison Wiesnegg, 1831)

INGÉNIEUR-CONSTRUCTEUR

64, RUE GAY-LUSSAC, PARIS (5^e)

Téléph. : ODÉ. 06-25

Télégr. WIESNEGG-Paris 38

— AUTOCLAVES POUR STÉRILISATION —
ÉTUVES A TEMPÉRATURES CONSTANTES
MATÉRIEL DE REMPLISSAGE D'AMPOULES
APPAREILS A DISTILLER — A CONCENTRER

DEVIS SUR DEMANDE

FILTRE CHAMBERLAND SYSTÈME PASTEUR

80 BIS, RUE DUTOT — PARIS-XV. VAUGIRARD 26-53

LE SEUL FILTRE MIS AU POINT DANS LE LABORATOIRE DE PASTEUR
ET AUTORISÉ PAR LUI A PORTER SON NOM

— STÉRILISATION A FROID —
APPLICATION PARTICULIÈRE A L'ÉPURATION DES EAUX
BOUGIES SPÉCIALES POUR L'USAGE DU LABORATOIRE

MANUFACTURE DE GRILLAGES ET TOLERIE CAGES POUR ÉTUDES BACTÉRIOLOGIQUES

SOCIÉTÉ DES
ÉTABLISSEMENTS

PIARRETTE

FONDÉS
EN 1905

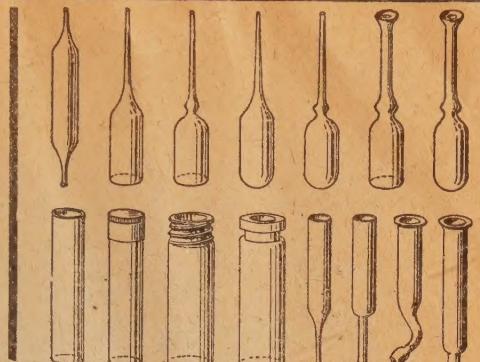
Société à Responsabilité Limitée au Capital de 300.000 Francs

SERVICE COMMERCIAL: 17, RUE DES GRANDS-AUGUSTINS, PARIS-6^e
C. C. Postaux: Paris 1361-76 TÉL.: DANTON 97-75 Reg. Com. Seine 291.124 B

Fournisseur de l'Institut Pasteur et de la Faculté de Médecine.

Verre Vitrification

5, Rue de Crimée
PARIS-XIX^e



MACHINES A IMPRIMER

OYONNAX -  - FRANCE

10, Boulevard Dupuy — Tél. 3-55

MACHINES SPÉCIALES POUR L'IMPRESSION
DES AMPOULES ET DES FLACONS

CATALOGUE SUR DEMANDE

Représentant : R. CHAMOUSSET, 8, rue Nicolas-Charlet, PARIS-XV^e

FOURNITURES POUR LABORATOIRES

VERRERIE GÉNÉRALE

Verre ordinaire, Bohème, Pyrex

Verrerie soufflée et graduée

Aérométrie. Densimétrie

Thermométrie — Porcelaine

Papiers à filtrer - Caoutchouc

Appareillage

TOUTES PIÈCES SUR CROQUIS

TROUVE & CHOLIN,

39-41 RUE DES CLOYS, PARIS (18^e)

Tél. : Montmartre 61-81

Catalogue Général sur demande



MAISON VERICK-STIASSNIE

STIASSNIE FRÈRES

Constructeurs

67, Boulevard Auguste-Blanqui, 67
PARIS

MICROSCOPES

MICROTOMES

CRÉSYL-JEYES

DÉSINFECTANT ANTISEPTIQUE

EMPLOYEZ LE " JEYES "

Produit très imité, jamais égalé. Action rapide et constante

La PUISSANCE ANTISEPTIQUE du CRÉSYL-JEYES est DIX FOIS plus grande
que celle du Crésyloïl à 50 % de Crésol.

FABRICATION SPÉCIALE ET EXCLUSIVE RÉFÉRENCES ET PRIX SPÉCIAUX AUX ADMINISTRATIONS

PRODUITS SANITAIRES ET ANTISEPTIQUES

18, Rue Charles-Bassée, FONTENAY-SOUS-BOIS (Seine) Tél. : TREMBLAY 05-17

COGIT

36, BOULEVARD SAINT-MICHEL, PARIS — Tél. : Danton 65-37

MICROSCOPES

MICROTOMES

ÉTUVES

CENTRIFUGEURS

HÉMOLEUCOMÈTRE COSTIL-FLAD

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

FORMATION
ET PROPRIÉTÉS DE LA FONCTION-ANTICORPS
CORRESPONDANT AUX MOLÉCULES ORGANIQUES
DE FAIBLE Poids MOLECULAIRE

par J. LOISELEUR

(avec l'assistance de M^{me} M. SAUVAGE).

(*Institut Pasteur, Service de Chimie-Physique.*)

Un travail antérieur (1) a montré que les molécules organiques de faible poids moléculaire se comportent comme de véritables antigènes et entraînent la formation d'anticorps spécifiques.

La multiplicité des faits et des vérifications expérimentales permet maintenant d'établir les caractéristiques de ce genre nouveau d'immunité. On retrouve toutes les propriétés générales des anticorps correspondant aux antigènes protéidiques, mais ces propriétés sont ici atténuées par suite du faible volume moléculaire de l'antigène : le pouvoir flocculant est peu marqué, tout en étant indiscutable. Par contre, l'antigène peut être séparé de l'anticorps par simple dialyse, ce qui facilite l'interprétation des faits. On constate ainsi l'apparition très rapide d'une « fonction-anticorps », résultant de l'adaptation directe des globulines à l'antigène.

I. — Techniques employées pour la recherche des anticorps.

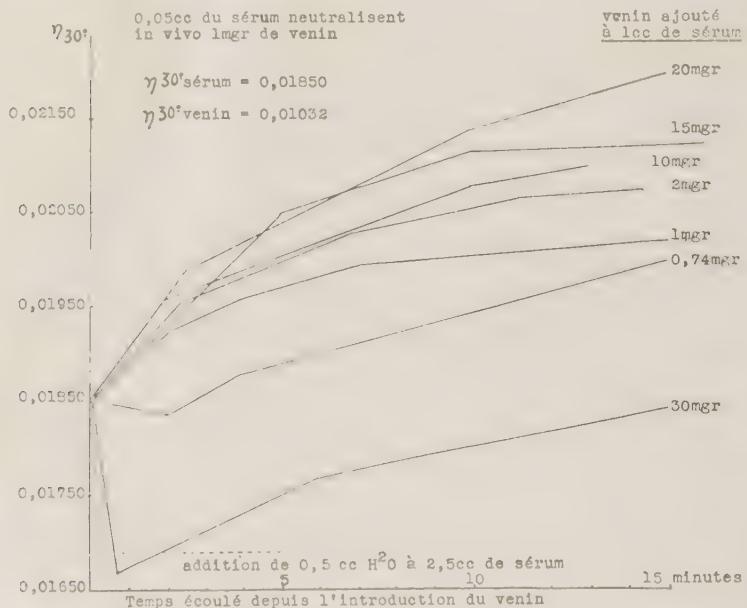
Tout le début de ce travail a reposé sur l'emploi exclusif de tests physico-chimiques (mesure des variations spécifiques de la

(1) J. LOISELEUR et M^{me} M. LÉVY. *Ces Annales*, 1947, 73, 116.

viscosité ou de l'indice réfractométrique) qui étaient appliqués au sérum total.

Un grand progrès a pu être réalisé grâce à la localisation constante de l'anticorps dans les globulines, ce qui permet d'opérer sur une *fraction purifiée du sérum*. Par suite de l'élimination des constituants inertes du sérum, la sensibilité des tests est considérablement amplifiée et la flocculation qui se manifeste fréquemment vient épauler les résultats précédents.

Il suffit de rappeler l'essentiel des méthodes physico-chimiques



Courbe I (a).

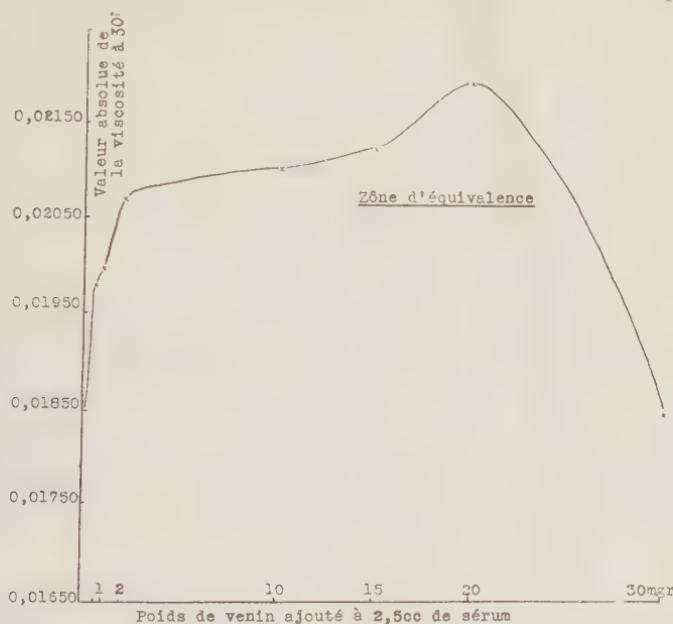
[Voir légende à la courbe I (b).]

qui ont déjà été exposées. Elles reposent sur l'analyse des phénomènes qui accompagnent la flocculation. Celle-ci est évidemment précédée de la rencontre de l'antigène et de l'anticorps, c'est-à-dire de l'accolement des deux molécules (J. Bordet), ce qui se traduit par l'augmentation de la viscosité. La technique consiste, comme on le sait, à suivre dans un micro-viscosimètre (type Couette, perfectionné par Lecomte de Nouy, Chaix et Verrain) l'évolution des variations *instantanées* de la viscosité du sérum quand on y introduit l'antigène.

À titre de justification, voici l'application [courbe I (a)] de cette technique à l'étude d'un sérum antivipérin. On constate que la

viscosité augmente progressivement avec l'addition de venin, pour atteindre son maximum à 20 mg. : l'addition de 30 mg. provoque, au contraire, une chute de la viscosité. Or, précisément, d'après la technique biologique (par injection, à la souris, d'un mélange de sérum et de venin), le sérum neutralise 20 g. de venin.

Pour faire apparaître la zone d'équivalence, il suffit de porter



Courbe I (b).

TITRAGE DU SÉRUM ANTIVIPÉRIN PAR LA MÉTHODE DE VISCOSITÉ.

On introduit d'abord [courbe I (a)], dans le viscosimètre, 2,5 cm³ du sérum anti-vipérin étudié : la valeur de la viscosité se stabilise à 0,01850. A ce moment, sans démonter l'appareil, on ajoute 0,5 cm³ de NaCl à 7 p. 1.000 contenant 0,74 mg. de venin. La viscosité augmente jusqu'à 0,01953. On rejette ce mélange et on répète les opérations précédentes en introduisant des quantités croissantes de venin (chaque fois dissoutes dans le volume constant de 0,5 cm³).

On constate, sur les courbes, que la viscosité augmente d'abord à chaque addition, puis tombe brusquement quand la concentration de venin atteint 30 mg.

Dans la courbe I (b), on a porté en abscisse les quantités de venin et en ordonnée les valeurs correspondantes de la viscosité de façon à obtenir la figuration de la zone d'équivalence.

en abscisse [courbe I (b)] les poids de venin ajoutés au sérum et en ordonnée les valeurs correspondantes de la viscosité.

Cette technique de viscosité sera employée constamment par la suite, de préférence à la mesure des variations de l'indice réfractométrique, méthode aussi sensible, mais beaucoup plus laborieuse :

la méthode de viscosité permet d'étudier un sérum, en quelques heures, avec 8 à 10 points de la courbe, tandis que la méthode réfractométrique exige plusieurs semaines.

Nota. — 1^o Pour réduire les quantités de sérum, on emploie toujours une dilution de sérum au 1/2 dans une solution de NaCl à 7 p. 1.000 et à pH = 7,4.

2^o Quand la mesure de viscosité est terminée, on transvase dans un tube à essai, le mélange de sérum et d'antigène et l'on porte à l'étuve à 45° pendant plusieurs heures. On note alors, s'il y a lieu, l'apparition et l'importance de la flocculation.

II. — Diversité des antigènes expérimentés.

Les expériences ont été faites avec les molécules organiques les plus diverses, appartenant à la série grasse ou à la série aromatique (tableau I).

TABLEAU I. Antigènes expérimentés (antigènes hydrosolubles).

Ethanol.	Xylose.	Acétate Na.	Ethylamine.	Glycocolle.
Phénol.	Arab nose.	Lactate Na.	Aniline	Alanine.
Hydroquinone.	Mannose.	Tartronate Ca.	p-phénylène-diamine.	Leucine.
Gaïacol.	Saccharose.	d-tartrate Na.		Cysteine.
	Tréhalose	Citrate Na.		Arginine.
	Raffinose.	Oléate Na.		Histidine.
	Glucosamine.	Benzoate Na.		Phénylalanine.
		Salicylate Na.		
		Phtalate Na.		
Véronal.	Disulfonate d'indigo.	α-ascorbutique.		Phlorydzine.
Antipyrine.	Vert naphtochrome.	α-nicotin que.		Morphine.
Pyramidon.	Bleu de méthylène.	α-doisynolique.		
p-aminophényl-sulfamide.				
Pénicilline.				
Streptomycine.				

En mettant à part le cas des colorants, l'expérience montre que toutes ces molécules possèdent, à des degrés qui seront étudiés ultérieurement, le pouvoir antigène et sans qu'aucun échec ou résultat douteux ait été observé. Leur propriété commune est d'être soluble dans l'eau à pH = 7,4.

Pour les colorants, le pouvoir antigène est l'inverse de leur pouvoir tinctorial. Pour être antigénique, le sulfonate d'indigo doit être injecté à forte dose. Le vert naphtochrome est un antigène très médiocre. Quant au bleu de méthylène, il est dépourvu de tout pouvoir antigène, quelle que soit la dose — même létale — mise en œuvre. Or, parmi ces colorants, le bleu de

méthylène possède le pouvoir tinctorial le plus élevé. On verra, par la suite, que la formation de l'anticorps est liée au maintien de l'antigène dans la circulation, condition qui n'est plus réalisée si, dès son introduction, l'antigène se fixe sur l'endothélium vasculaire.

Toxicité de certains antigènes. — Les doses élevées requises pour la préparation de l'animal entraînent, pour certains de ces antigènes, des effets toxiques qui, d'ailleurs, n'entraînent nullement la formation de l'anticorps.

Le phénol entraîne une élévation immédiate de la température. On observe, après quelques jours de traitement, une nécrose progressive des extrémités des membres, suivie de la chute du derme, puis de l'élimination des os. Finalement, après vingt jours de traitement, l'animal ne présente plus que des moignons.

Le salicylate de Na entraîne une chute abondante des poils.

L'hydroquinone provoque un amaigrissement rapide (perte de poids d'environ 10 p. 100 en sept jours).

La streptomycine, à forte dose, paralyse le train postérieur, accident qui disparaît avec la cessation du traitement.

Pour certains antigènes, comme la morphine, il est préférable d'administrer des doses croissantes, mais en prolongeant le traitement pendant plusieurs semaines.

On note, par contre, l'innocuité totale de l'éthanol administré en injections intramusculaires : un lapin peut subir impunément, pendant quinze jours consécutifs, l'injection quotidienne de 10 cm³ d'alcool pur, en dilution au 1/2 dans du sérum physiologique. On ne constate ni amaigrissement, ni lésions hépatiques.

Cas des antigènes insolubles dans l'eau. — L'expérience a porté sur les molécules suivantes (tableau II) :

TABLEAU II. — Molécules expérimentées (molécules liposolubles).

Benzaldéhyde.	Testostérone (propionate).
Salicylate d'amyle.	Bromotriphénylethylène.
Cinnamate d'éthyle.	
Exaltolide.	

Ces molécules sont dissoutes dans l'huile d'olive et injectées sous la peau (5 cm³ chaque fois). Immédiatement après on masse légèrement, de façon à étaler sous la peau le nodule d'huile et accélérer la résorption. Malgré un traitement prolongé, il n'a jamais été possible d'observer, dans ces conditions, la formation d'anticorps.

En résumé, l'examen des tableaux I et II permet de fixer les conditions pour qu'une molécule organique soit antigénique :

1^o *La condition essentielle est de posséder la solubilité dans l'eau à pH = 7,4, condition qui permet à la molécule de pénétrer dans la circulation.*

2° Il n'existe aucune limite inférieure pour le poids moléculaire de l'antigène, puisque l'éthanol et l'acétate de Na constituent déjà des antigènes remarquables.

3° La valeur antigénique est indépendante de la présence de l'azote dans la molécule.

Nota. — L'influence des divers groupements fonctionnels sera considérée ultérieurement.

III. — Méthodes de préparation des animaux.

Quand on prépare un animal par l'injection d'un antigène protéidique, la première étape consiste évidemment à mettre l'antigène au contact des protéides plasmatiques dans la circulation, c'est-à-dire dans l'ensemble constitué par les capillaires, le système réticulo-endothélial et la lymphe interstitielle. Ce contact se prolonge (2) jusqu'à ce que l'antigène ait subi une dégradation compatible avec son élimination rénale.

Si l'on applique la même technique en prenant comme antigène une simple molécule organique de faible poids moléculaire [3 (a)], on n'obtient pas la formation d'anticorps. Il faut alors recourir au couplage de cette petite molécule organique sur un antigène protéidique. Les anticorps que Landsteiner, Gobel, Avery et leurs collaborateurs ont ainsi préparés sont spécifiques de la molécule organique (acide tartrique, acide phénylarsinique...) couplée sur la protéide auxiliaire.

J'ai été conduit à supposer : 1° que, dans le système antigénique précédent, le rôle de la protéine auxiliaire consiste simplement à maintenir dans la circulation la petite molécule organique ; 2° que la molécule organique ne forme pas à elle seule un anticorps, parce que sa petite taille entraîne une grande diffusibilité, ce qui ne lui permet pas de persister dans la circulation pendant la durée requise pour la formation de l'anticorps ; 3° qu'il doit être possible d'opérer avec la petite molécule organique seule, à condition d'adapter la technique de préparation — les doses et la cadence des injections — à la structure physique particulière de l'antigène. On est conduit ainsi à préparer les animaux par une sorte d'inondation continue de l'organisme.

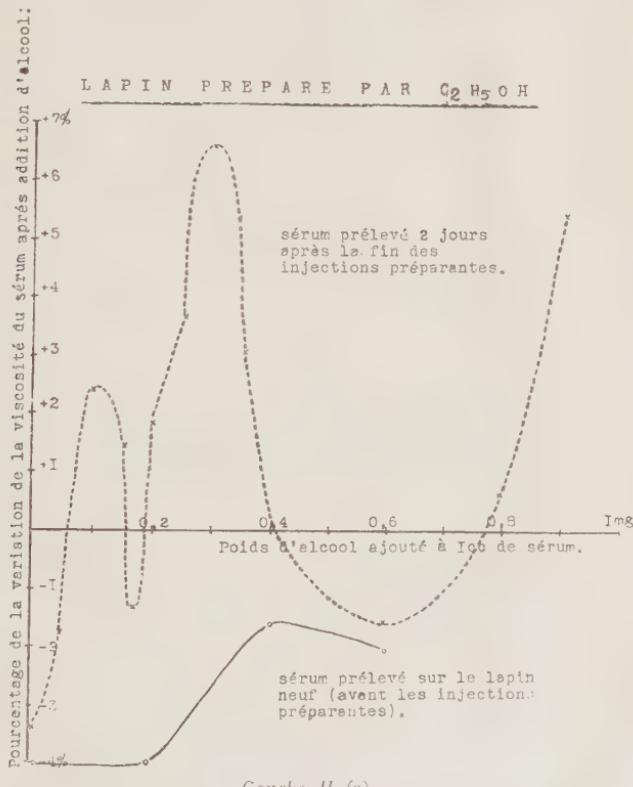
Toutes les expériences ont été faites sur le lapin.

2) Sauf exception pour le cas d'un protéide spécifique (hormone protéidique, toxine, venin) qui subit une fixation directe dès qu'il pénètre dans la lymphe qui baigne le tissu réceptif.

3 (a)] Il est à rappeler que M^{me} Y. AIMARD a montré que certaines molécules organiques couplées sur la tyrosine, ainsi que les acides uréorématiques, possèdent des propriétés antigéniques très nettes (*Rapports entre la spécificité sérologique et la constitution chimique de quelques antigènes*, Paris, 1939).

A côté de la méthode, déjà décrite, par injections préparantes multiples prolongées pendant dix à vingt jours consécutifs, deux nouvelles méthodes sont satisfaisantes : l'emploi d'une forme insoluble de l'antigène et l'administration de doses massives. Nous allons comparer rapidement l'efficacité de ces trois méthodes.

a) INJECTIONS PRÉPARANTES MULTIPLES. — Cette méthode reste excellente et a permis de préparer des centaines d'animaux. Elle



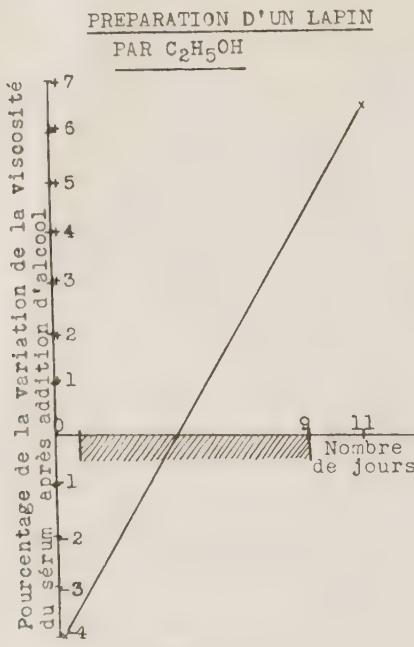
ÉPREUVE DE VISCOSITÉ SUR LE SÉRUM D'UN LAPIN PRÉPARÉ AVEC L'ÉTHANOL.
(Les épreuves de viscosité sont faites sur le sérum total, non purifié.)

1° En trait plein (courbe inférieure), chez l'animal neutre, non préparé, l'addition de quantités croissantes d'alcool à des volumes identiques de sérum entraîne toujours une chute de la viscosité. Chaque point de la courbe correspond à l'addition de 0,0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 mg. d'alcool dans 1 cm³ de sérum. Les valeurs portées sur la courbe expriment le pourcentage de la variation (positive ou négative) de la viscosité. Dans le cas présent, il s'agit toujours d'une diminution.

2° Le lapin subit, pendant neuf jours, 18 injections intramusculaires d'alcool. Le sérum, prélevé quarante-huit heures après la cessation du traitement, montre, dans 3 zones étroites, une augmentation de la viscosité, consécutivement à l'addition de quantités croissantes d'alcool (courbe supérieure en pointillés). La mesure de la viscosité révèle ainsi les zones d'équivalence ; le maximum (+ 6,4 p. 100) est atteint ici par l'addition de 0,3 mg. d'éthanol à 1 cm³ de sérum.

consiste à administrer 2 à 4 injections intramusculaires quotidiennes (à neuf, douze, quatorze et dix-huit heures), chacune de 5 cm³ et contenant au minimum 50 à 100 mg. d'antigène.

Voici, à titre d'exemple, la préparation d'un lapin (2 kg.) par l'éthanol. On pratique d'abord sur l'animal neuf, avant traitement, l'épreuve de viscosité. Pour cela, on introduit dans le viscosimètre 2,5 cm³ de sérum dilué au 1/2 et on mesure la viscosité. Quand



Course II (b).

REPRÉSENTATION DANS LE TEMPS DE LA COURBE I.

(Les épreuves de viscosité sont faites sur le sérum total, non purifié.)

En abscisse la durée de l'expérience, en jours.

En ordonnée, le pourcentage de la variation de la viscosité du sérum, consécutivement à l'addition d'alcool. Ces dernières valeurs sont relevées sur la courbe précédente : avant l'expérience sur le lapin neuf (jour « zéro ») et deux jours après la fin de la préparation (le onzième jour). Cette représentation permet de saisir immédiatement l'apparition de l'anticorps à la fin de la période de préparation (zone hachurée).

la valeur est stable, et sans arrêter l'appareil, on ajoute 0,5 cm³ d'une solution de NaCl à 7 p. 1.000 et à pH = 7,4. On mesure à nouveau la viscosité, qui s'établit à une valeur inférieure, proportionnelle à la dilution qui vient d'être imposée au sérum. Le pourcentage de cet abaissement est porté sur la courbe [point à — 4 p. 100 sur la courbe II (a)]. On nettoie l'appareil, on répète la mesure en introduisant à nouveau 2,5 cm³ de sérum ;

mais, après l'équilibre, on introduit $0,5 \text{ cm}^3$ de NaCl à 7 p. 1.000 qui contient 0,1 mg. d'alcool. On continue ainsi à explorer toutes les concentrations d'éthanol jusqu'à 1 mg. Comme il s'agit d'un sérum *quelconque* et d'un antigène *quelconque*, les molécules d'antigène se distribuent au hasard, sans aucune relation définie avec les molécules sériques, et l'ensemble de la courbe présente chaque fois une diminution de la viscosité.

Pendant neuf jours, l'animal subit 4 injections intramusculaires quotidiennes, chacune de 5 cm^3 d'une dilution d'alcool absolu au 1/2 dans du sérum physiologique. La prise de sang a lieu après un repos de quarante-huit heures. L'épreuve de viscosité, pratiquée dans les mêmes conditions qu'avant la préparation de l'animal, montre une augmentation de viscosité, localisée dans 3 zones étroites qui constituent les zones d'équivalence. Cette augmentation résulte de la présence d'un anticorps [3 (b)] spécifique de l'éthanol et de l'accolement des deux molécules.

Il est commode, pour représenter la chronologie de l'expérience, de porter le temps en abscisse et, en ordonnée, les pourcentages des variations de la viscosité [courbe II (b)], en adoptant, comme valeur, celle qui est relative au maximum.

b) PRÉPARATION PAR UNE FORME INSOLUBLE DE L'ANTIGÈNE. — On peut tout aussi bien préparer l'animal par l'injection discontinue (7 injections en quinze jours) d'une forme insoluble — ou du moins peu soluble — de l'antigène. Sa lente dissolution par les électrolytes du plasma assure la libération constante de l'antigène dans la circulation. On revient finalement au cas précédent, mais en utilisant la chronologie employée classiquement pour la préparation d'un animal par un antigène protéidique. Il est évident que ce mode de préparation reste limité à ceux des antigènes qui peuvent se prêter à la formation de combinaisons insolubles. Voici, à titre d'exemple, la préparation d'un lapin par le tartrate de Ca.

A 2 g. de tartrate de K dissous dans 20 cm^3 d'eau, on ajoute 1,2 g. de CaCl_2 dissous dans 20 cm^3 d'eau. On centrifuge, on lave deux fois le précipité à l'eau distillée et on le met finalement en suspension dans 50 cm^3 de NaCl 7 p. 1.000. Un lapin

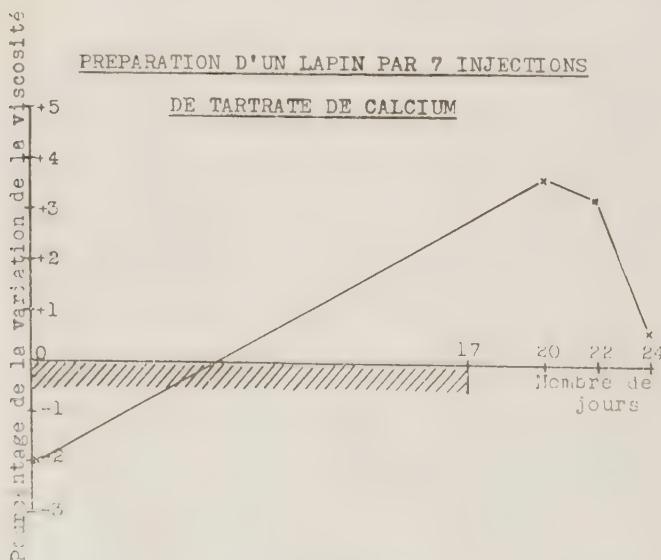
[3 (b)] Pour l'instant, nous pouvons strictement conclure, d'après l'examen de la courbe II (a), que le traitement du Lapin par l'éthanol a fait apparaître une aptitude de combinaison du sérum pour l'éthanol, tandis que, dans le sérum de l'animal neuf avant traitement, la dispersion de l'éthanol était désordonnée et sans aucune relation définie avec les molécules sériques. Mais l'ensemble des propriétés superposées à cette « aptitude de combinaison » autorise à l'assimiler à un anticorps. Les faits expérimentaux montreront par la suite qu'il est plus correct de définir ici non un anticorps, mais une « fonction-anticorps »

(2,26 kg.) subit l'injection intramusculaire de cette suspension selon la cadence suivante (tableau III) :

TABLEAU III. — **Préparation d'un lapin par l'injection intramusculaire d'une suspension de tartrate de Ca.**

	MEMBRE arrière-droit (cm ³)	MEMBRE arrière-gauche (cm ³)	MEMBRE avant-droit (cm ³)	MEMBRE avant-gauche (cm ³)
1 ^{er} jour	1,5	1,5		
3 ^e jour	1,5	1,5		
6 ^e jour	1,5	1,5		
8 ^e jour	3	3		
10 ^e jour	3	3		
12 ^e jour	3	3	3	
14 ^e jour	3	3	3	3

Le sérum, prélevé le vingtième jour et éprouvé avec le tartrate de Na, donne une réponse positive. L'épreuve, répétée les jours



Curbe III.

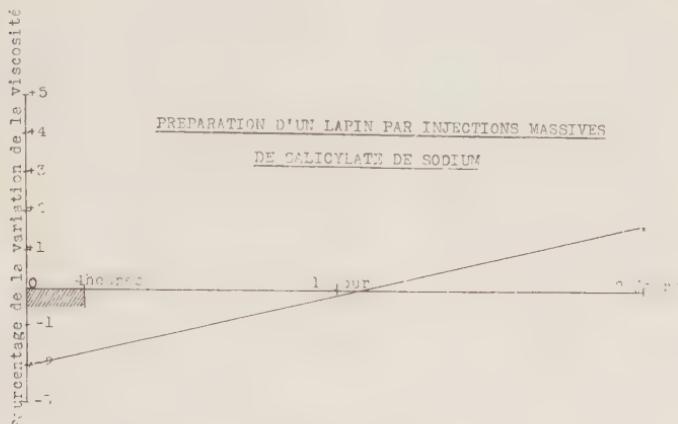
PRÉPARATION D'UN LAPIN PAR LA MÉTHODE CLASSIQUE, AVEC UN ANTIGÈNE INSOLUBLE. Les épreuves de mesures sont faites sur le sérum total, non purifié

pt jours, l'animal subit 7 injections intramusculaires de tartrat n total 0,075 M). Les injections sont espacées de deux à trois joi la méthode classique de préparation par des antigènes protéique atte l'apparition de l'anticorps le troisième jour après la cessatio intensité de la action décroît i

suivants, montre la disparition rapide de l'anticorps. Il est important de noter que l'épreuve est opérée sur le sérum entier, non purifié.

c) PRÉPARATION RAPIDE PAR ADMINISTRATION DE DOSES MASSIVES. — Il est possible de préparer un animal très rapidement — en quelques heures — par l'administration de doses massives de l'antigène, en répétant l'injection au moins toutes les heures. Cette technique est très utile pour étudier le mode de formation des anticorps.

Un lapin de 3,190 kg. subit, pendant quatre heures, l'injection



Curbe IV (a).

PRÉPARATION D'UN LAPIN PAR 10 INJECTIONS MASSIVES DE SALICYLATE.
(Les mesures de viscosité sont faites sur le sérum total, non purifié.)

L'animal subit, de 9 heures à 13 heures, 10 injections intramusculaires de salicylate de Na (300 mg.). L'anticorps se manifeste deux jours après.

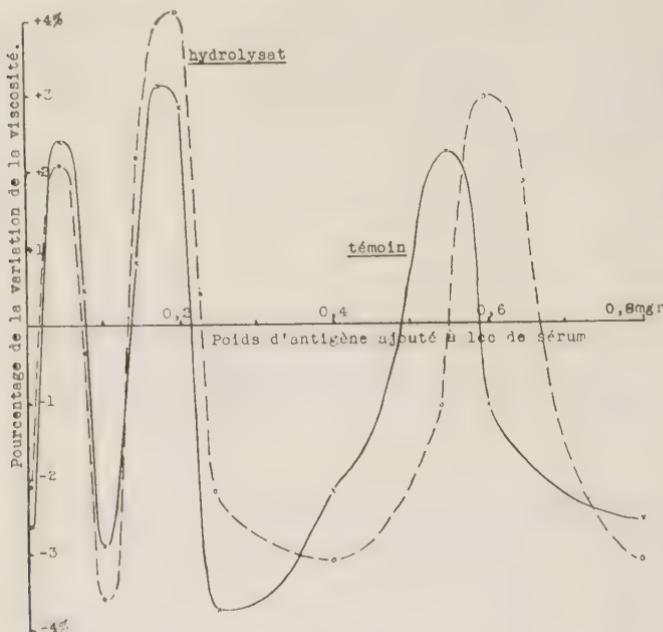
d'une solution à 6 p. 1.000 de salicylate de Na (chaque demi-heure. 2 injections intramusculaires de 5 cm³ chacune). Le sérum, prélevé le troisième jour, témoigne de la présence de l'anticorps [courbe IV (a)].

ACTION NULLE DES PRODUITS DE LYSE. — Voici une expérience négative, mais importante au point de vue théorique.

Si la formation de l'anticorps repose sur un remaniement des globulines au moment de leur élaboration, on peut s'attendre à augmenter le taux de l'anticorps par l'injection parallèle des produits de la lyse pancréatique de sérum ou de γ -globuline. La courbe IV (b) reproduit les résultats obtenus avec 2 animaux, préparés dans les mêmes conditions pendant douze jours.

par le tartrate de Na : l'un sert de témoin, l'autre a subi en même temps l'injection d'hydrolysat pancréatique de γ -globuline

ACTION DE L'HYDROLYSAT DE γ -GLOBULINE DE LAPIN



Curbe IV (b).

ACTION DES PRODUITS DE LYSE DE LA γ -GLOBULINE.

Deux lapins subissent, pendant douze jours, la même préparation par l'acide tartrique (1,2 g. en 24 injections). L'un sert de témoin ; l'autre reçoit en même temps l'injection des produits de la lyse pancréatique de γ -globuline (lapin).

Ces produits de lyse restent sans action sur la formation et le taux de l'anticorps.

de lapin. Le résultat reste inchangé, l'écart insignifiant entre les deux courbes relevant du facteur individuel.

CONDITIONS GÉNÉRALES DE LA PRÉPARATION. — Les trois techniques précédentes aboutissent à la formation d'anticorps spécifiques qui peuvent être mis en évidence deux à quatre jours après la dernière injection préparante, c'est-à-dire après le laps de temps nécessaire à l'élimination de l'antigène introduit au cours des injections préparantes et à la libération de l'anticorps. L'élimination rapide de l'antigène impose ici une chronologie particulière.

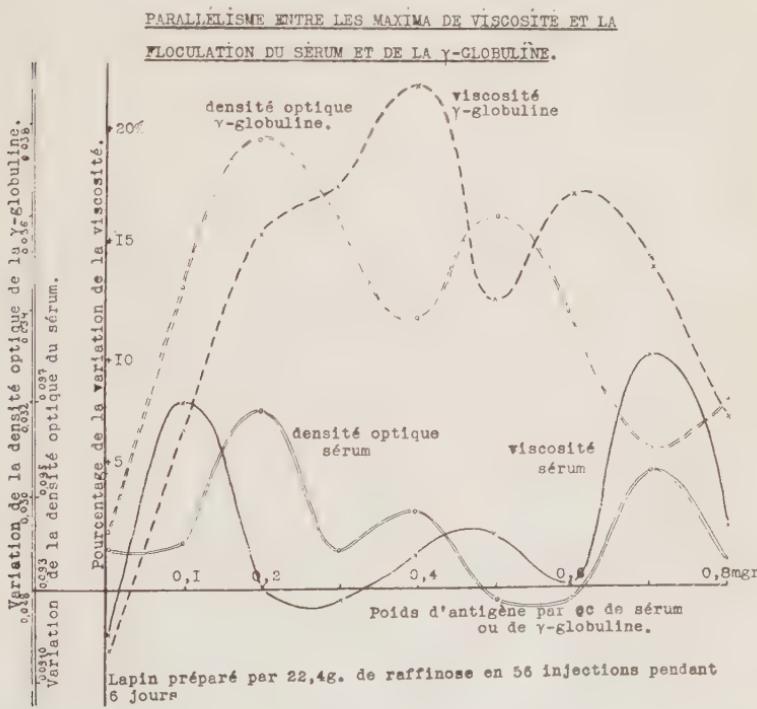
De toutes les expériences, il résulte que le *poids total d'antigène mis en œuvre dans la préparation de l'animal est plus important que la durée pendant laquelle cet antigène exerce son action* :

la meilleure méthode de préparation est l'envasissement brutal de la circulation par une grande masse d'antigène.

Autre point important : le taux de l'anticorps est limité. Ni l'augmentation indéfinie du poids d'antigène injecté, ni celle de la durée de la préparation n'entraînent une augmentation correspondante du taux de l'anticorps. Ce taux atteint rapidement une limite qui ne peut être dépassée. On verra ultérieurement que l'augmentation de la dose préparante entraîne, par contre, une diminution de la spécificité de l'anticorps.

IV. — Localisation de l'anticorps dans la γ -globuline.

Jusqu'à maintenant, les réactions ont été faites sur le sérum total. Or, l'anticorps ne constitue qu'une faible partie du sérum : autrement dit, quel que soit le test employé pour mettre l'anticorps en évidence, la sensibilité de la technique est diminuée par



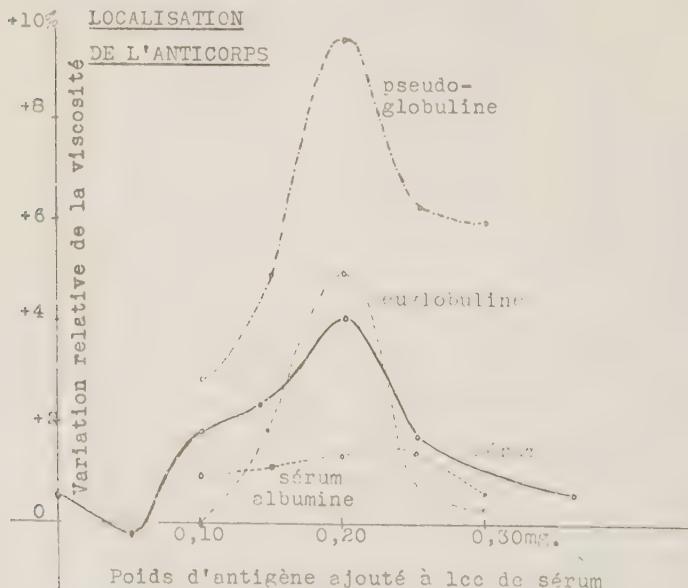
FLOCULATION DU SÉRUM PRÉPARÉ, EN PRÉSENCE DE SON ANTIGÈNE.

Animal préparé avec le raffinose. L'addition de raffinose entraîne la floculation du sérum total aussi bien que de la γ -globuline. La floculation est mesurée par les variations de la densité optique. A noter, dans les deux cas, le parallélisme entre les courbes de viscosité et de densité optique.

la masse des protéines inertes qui ne participent pas à la réaction, qu'il s'agisse du test de la viscosité, de la mesure de la variation de l'indice de réfraction et, surtout, de la flocculation, où les protéides inactifs jouent un rôle protecteur. De fait, l'observation de la flocculation avec les sérums préparés avec les antigènes considérés ici est extrêmement rare, sauf pour les antigènes d'un poids moléculaire plus élevé (raffinose, streptomycine...). La courbe IV (c) relate ainsi les flocculations (mesurées par les variations de la densité optique) qui apparaissent aussi bien dans le sérum total que dans la γ -globuline d'un animal préparé avec le raffinose.

Dans le cas général, les substances inactives du sérum s'opposent à l'apparition de la flocculation. Le plus grand intérêt s'attache donc à l'isolement et à la purification de l'anticorps. Différentes techniques ont été employées.

a) FRACTIONNEMENT PAR LE SULFATE D'AMMONIUM. — Il a déjà



Courbe V.

LOCALISATION DE L'ANTICORPS DANS LES PSEUDO-GLOBULINES.

Lapin préparé pendant sept jours par 26 injections de xylose. Le sérum prélevé le lendemain de la dernière injection est fractionné par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Les fractions successives sont dialysées, ramenées au même volume, puis examinées par l'épreuve de viscosité.

On constate : 1° que la presque totalité de l'anticorps est renfermée dans les pseudo-globulines ; 2° que, consécutivement à l'élimination des fractions inactives du sérum, la réaction de viscosité devient beaucoup plus importante sur les pseudo-globulines que sur le sérum total.

été montré qu'on peut localiser l'anticorps et purifier le sérum sans que le traitement lui fasse perdre ses propriétés spécifiques. Il est important de rappeler ici cette expérience :

Un lapin (2.800 kg.) est préparé, pendant sept jours, par une dose totale de 260 mg. de xylose, administrée en 26 injections intramusculaires. Le sérum, prélevé le lendemain de la dernière injection, est traité par des doses croissantes de sulfate d'ammonium. Les fractions successives (euglobulines, pseudo-globulines et sérum-albumine) sont amenées, après dialyse, à un même volume et examinées par l'épreuve de viscosité. La courbe V montre que l'anticorps est principalement localisé dans les pseudo-globulines. Ces dernières se montrent plus actives que le sérum entier et entraînent, en présence de l'antigène, un accroissement spécifique de viscosité plus élevé (9,4 au lieu de 3,9 p. 100). Cette augmentation se retrouve constamment (tableau IV) dans les pseudo-globulines isolées.

TABLEAU IV. — Localisation de l'anticorps.

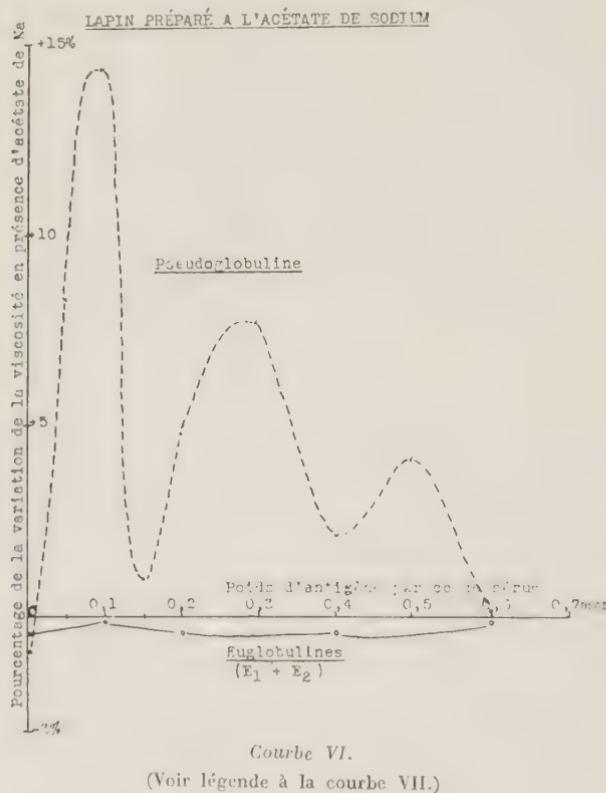
	ANTIGÈNE EXPÉRIMENTÉ		
	Xylose		Arabinose
	n° 1	n° 2	
Durée de la préparation (en jours).	7	4	6
Dose totale injectée (en mg.). . .	260	160	420
Nombre d'injections.	28	16	21
Pourcentage de l'augmentation du test de viscosité :			
Avec le sérum entier (1) . . .	3,9	1,9	5,5
Avec les euglobulines . . .	4,8	2,1	6,5
Avec les pseudo-globulines .	9,4	3,3	4,8
Avec la sérum-albumine . . .	1,4	1,2	1,5

(1) Prélevé le lendemain de la dernière injection préparante.

b) FRACTIONNEMENT DES EUGLOBULINES. — Nous avons utilisé une autre méthode de fractionnement (méthode de Pérez et Sandor) qui permet d'isoler les euglobulines. Un lapin est préparé pendant treize jours avec une dose totale de 4,6 g. d'acétate de Na, administrée en 20 injections intramusculaires. Le sérum, prélevé quarante-huit heures après la fin du traitement, est dilué au 1/3 par addition d'eau distillée et dialysé pendant vingt heures à la glacière sur eau bidistillée. Au cours de la dialyse, on renouvelle à deux reprises l'eau distillée du dialyseur. On obtient ainsi une première fraction E₁ d'euglobuline. On acidifie avec précaution par addition d'acide acétique jusqu'à pH = 6,4. Il se produit

un deuxième précipité E_2 d'euglobuline. On centrifuge ces deux fractions ($E_1 + E_2$) que l'on amène à 7,4 et redissout dans une solution de NaCl à 7 p. 1.000. Le restant du liquide, amené à 7,4, est additionné d'un volume égal d'une solution saturée de $\text{SO}_4-(\text{NH}_4)^2$, puis dialysé. Finalement, toutes ces fractions sont amenées à un volume double de celui du sérum.

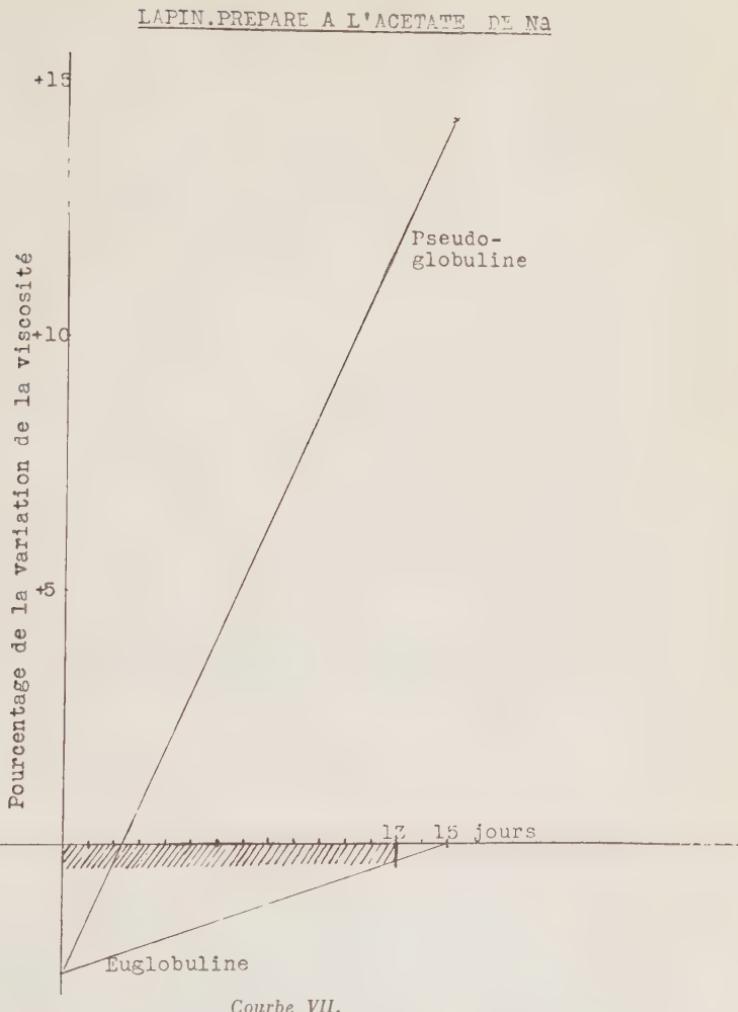
L'épreuve de viscosité montre (courbes VI et VII) que la tola-



lité de l'anticorps se trouve dans les pseudo-globulines, alors que les fractions d'euglobulines ($E_1 + E_2$) sont inactives.

Nota. — L'étude des variations électrophorétiques du sérum au cours de la préparation sera publiée ultérieurement.

c) PROCÉDÉ PRATIQUE POUR LA PURIFICATION DES SÉRUMS. — On est ainsi conduit à opérer exclusivement sur le sérum purifié. Voici le procédé pratique qui est constamment employé :



LOCALISATION DE L'ANTICORPS DANS LES PSEUDO-GLOBULINES.

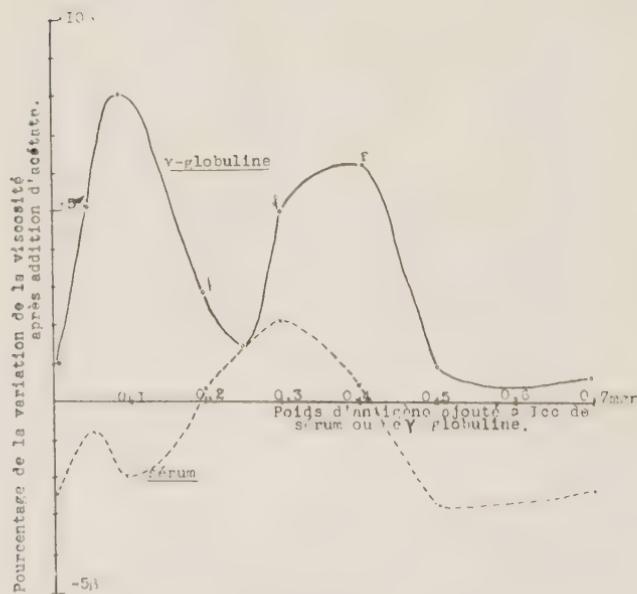
Un lapin est préparé pendant treize jours par 20 injections intramusculaires d'acétate de Na (au total 4,6 g.). L'épreuve de viscosité est faite, quarante-huit heures après la fin du traitement : 1^o sur les euglobulines ($E_1 + E_2$) isolées d'abord après dialyse, puis après ajustement du pH à 6,4; 2^o sur la fraction pseudo-globulinique restée en solution. La courbe VI montre que les pseudo-globulines renferment la totalité de l'anticorps. La courbe VII représente l'évolution de la formation de l'anticorps au cours de la préparation de l'animal.

On mesure le volume V du sérum (qui doit être parfaitement limpide). On refroidit à 0° et on ajoute un volume $\frac{V}{2}$ d'une solution saturée de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)^2$ amenée à $\text{pH} = 7,4$ et à 0° .

On agite et on centrifuge.

Le culot est redissous en ajoutant $V \text{ cm}^3$ d'une solution de NaCl

LAPIN PRÉPARÉ À L'ACÉTATE DE SODIUM
(6,5g en 28 injections pendant 15j.)



Courbe VIII.

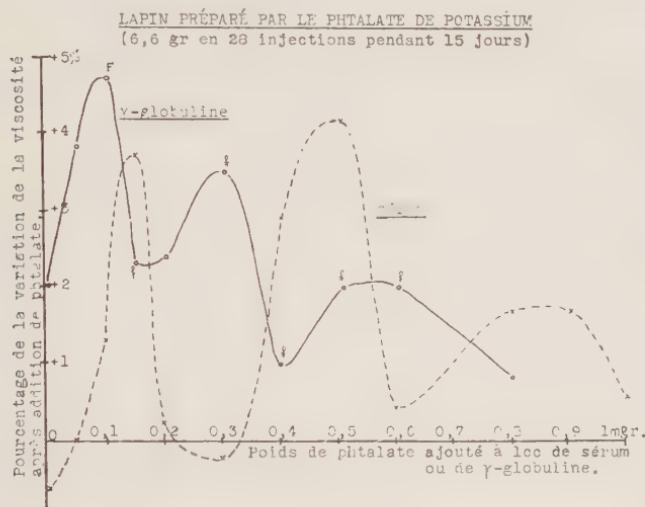
COMPARAISON DES RÉSULTATS DE L'ÉPREUVE DE VISCOSITÉ OPÉRÉE,
SOIT SUR LE SÉRUM TOTAL, SOIT SUR LA γ -GLOBULINE.

L'animal est préparé, pendant quinze jours, par 28 injections d'acétate de Na (6,5 g. au total). Trois jours après la fin du traitement, l'épreuve de viscosité est effectuée en double : 1^o sur le sérum total non purifié (courbe pointillée) ; 2^o sur la γ -globuline (courbe en trait plein). On remarque que, d'autre part, la réaction devient alors beaucoup plus intense consécutivement à l'élimination des substances inactives du sérum et, d'autre part, que la flocculation apparaît, en restant localisée sur le deuxième maximum de viscosité.

à 7 p. 1.000 et à 7,4 ; on précipite à nouveau en ajoutant $\frac{V}{2}$ de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)^2$ saturé. On agite. On centrifuge et on rejette le liquide en égouttant soigneusement le tube à centrifuger.

On dissout le précipité dans $V \text{ cm}^3$ d'eau distillée et on amène à 7,4. La dissolution du précipité doit être totale. On ajoute un

cristal de thymol et on transvase dans un dialyseur constitué par un cylindre (diamètre = 2 cm.) de cellophane très mince. On plonge le dialyseur dans une éprouvette contenant 3 litres de NaCl 7 p. 1.000, à pH = 7,4. On prolonge la dialyse pendant une semaine, en renouvelant, tous les jours, la solution extérieure. A la fin, on s'assure que la réaction de Nessler est négative. On amène alors à 2 V le volume de la solution protéique, par



Courbe IX.

COMPARAISON DE L'ÉPREUVE DE VISCOSITÉ SUR LE SÉRUM TOTAL
ET SUR LA γ -GLOBULINE.

Animal préparé pendant quinze jours par 28 injections de phtalate de K (6,6 g. au total). La réaction de la γ -globuline est beaucoup plus intense et s'accompagne en même temps de flocculation.

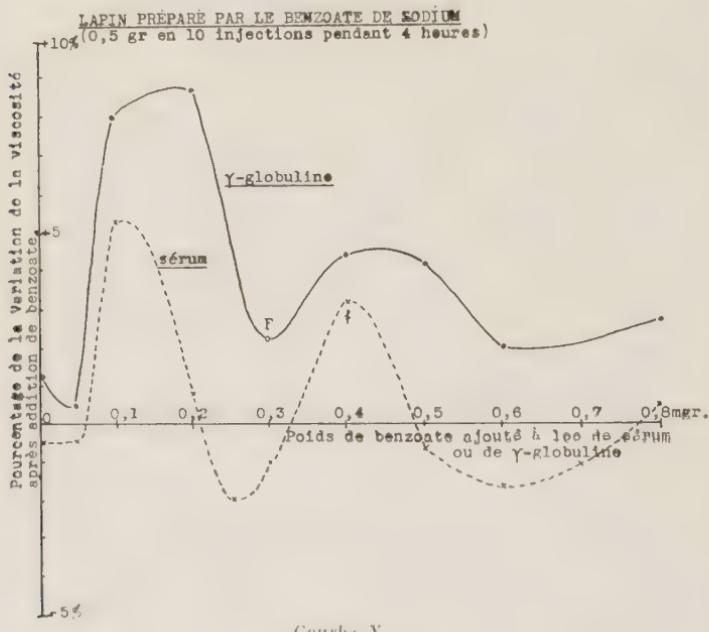
addition de NaCl à 7 p. 1.000 et à 7,4. On conserve la solution à la glacière en présence de thymol.

Nota. — 1° Au cours des manipulations, tous les volumes successivement indiqués doivent être mesurés avec précision.

2° Le sulfate d'ammonium et le thymol entraînent une dénaturation partielle, qui se traduit par l'apparition d'un très léger précipité.

3° Les dosages d'azote, pratiqués systématiquement sur la fraction ainsi isolée, sont dépourvus de signification. En effet, ce taux de l'azote varie avec la fréquence des saignées pratiquées sur l'animal, saignées importantes d'ailleurs, puisqu'elles atteignent un volume de 40 à 50 cm³ pour un lapin d'un poids moyen de 2 kg.

JUSTIFICATION DE LA TECHNIQUE. — Voici, à titre d'exemple, l'application de cette technique à des sérum d'animaux préparés par différents antigènes. L'épreuve de viscosité est, chaque fois, pratiquée en double, sur le sérum total non purifié et sur sa γ -globuline isolée par le procédé précédent. On constate dans tous les cas une augmentation de l'amplitude du test de viscosité. Les courbes VIII et IX sont relatives à des animaux préparés par injections multiples prolongées pendant plusieurs jours. Il est



Courbe X.

(Voir légende à la courbe XI.)

important d'observer, sur les courbes de γ -globuline, l'apparition de la flocculation (mentionnée sur chaque courbe par *f* ou *F*, selon son importance).

Les courbes X et XI sont relatives à des animaux préparés par la technique massive. On constate encore, dans ce cas, l'intérêt d'opérer avec le sérum purifié.

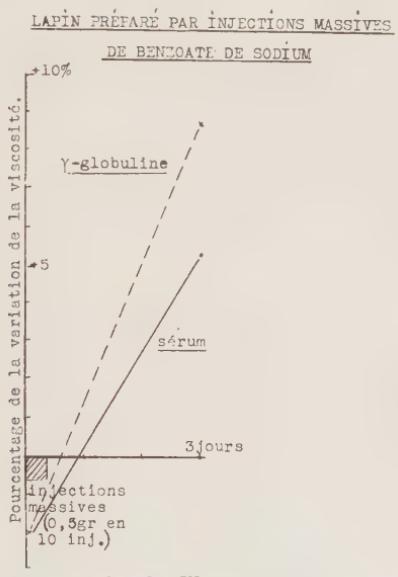
CONSERVATION DE L'ANTICORPS. — Le sérum, ainsi purifié, peut être conservé à la glacière pendant plusieurs semaines, soit après filtration sur bougie, soit en présence d'un cristal de thymol. Dans ce dernier cas, le thymol entraîne une légère dénaturation, caractérisée par l'apparition d'un très léger flocculat localisé autour du thymol. Ce précipité apparaît très rapidement, mais

n'augmente pas au cours de la conservation. La solution doit être centrifugée immédiatement avant l'emploi.

Nota. — Au cours de la préparation de la γ -globuline, et surtout au cours de la dialyse, on opère constamment en présence de thymol.

V. — Apparition et persistance de l'anticorps.

Jusqu'à maintenant, nous n'avons considéré la persistance de l'anticorps que dans le cas du lapin préparé par le tartrate de Ca



Courbe XI.

**COMPARAISON DU SÉRUM TOTAL ET DE LA γ -GLOBULINE
APRÈS PRÉPARATION PAR INJECTION MASSIVE DE BENZOATE DE Na.**

L'animal reçoit, le premier jour, de 9 heures à 13 heures, 10 injections intramusculaires de benzoate de Na (au total 500 mg.). Le sérum, prélevé le quatrième jour, est divisé en deux fractions : 1^o une moitié sert à l'épreuve de viscosité effectuée directement sur le sérum total ; 2^o l'autre moitié est transformée en γ -globuline. La courbe X montre que l'épreuve de viscosité est positive dans les 2 cas, mais plus importante avec la γ -globuline. La courbe XI est la représentation de l'expérience en fonction du temps.

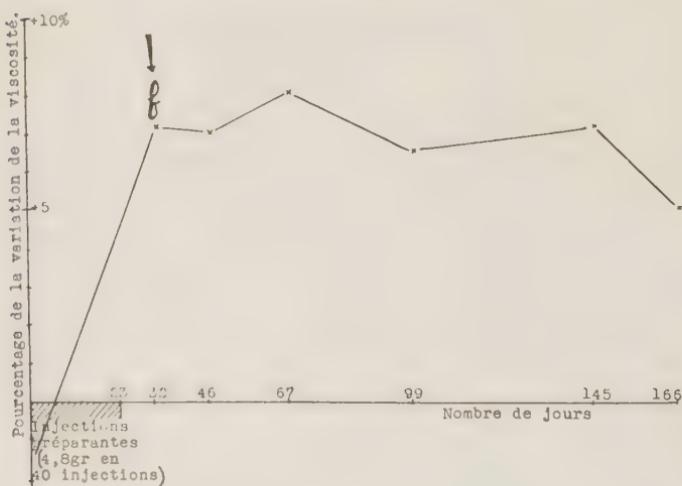
(courbe III), persistance qui semblait de très faible durée. Or, si l'on opère sur le sérum total non purifié, on ne peut avoir qu'une idée inexacte de l'évolution de l'anticorps, par suite de la masse des substances inertes qui masque rapidement le test de viscosité. En réalité, l'application de la technique de purifi-

cation qui vient d'être exposée permet de constater que l'anticorps persiste pendant plusieurs mois, au cours desquels son taux présente une lente décroissance, analogue à celle qui suit la préparation d'un animal par les gros antigènes protéidiques.

Considérons d'abord le délai nécessaire à l'apparition de l'anticorps :

a) APPARITION DE L'ANTICORPS. — L'anticorps se manifeste dès que l'antigène a été éliminé. Là encore, les choses se passent

LAPIN PRÉPARÉ PAR LA GLUCOSAMINE



Courbe XII.
PERSISTANCE DE L'ANTICORPS.

Animal préparé pendant vingt-trois jours par 40 injections de glucosamine (4,8 g. au total). Au cent soixante-sixième jour, l'anticorps conserve encore un taux notable.

On note, d'autre part, que le pouvoir flocculant n'apparaît — et encore faiblement — qu'au début seulement de la manifestation de l'anticorps.

comme pour les antigènes protéidiques, avec cette différence que l'antigène possède un volume moléculaire très faible, est plus soluble et est éliminé plus rapidement. Il en résulte une chronologie aussi particulière dans l'apparition de l'anticorps que pour la préparation de l'animal. *Ce délai d'apparition est toujours très réduit : il est d'autant plus court que l'antigène possède un poids moléculaire plus faible.* Par exemple, avec l'alcool ou l'acétate de Na, l'anticorps apparaît vingt-quatre à soixante-douze heures après la dernière injection préparante. Au contraire, pour la streptomycine, le délai est de quatre à six jours.

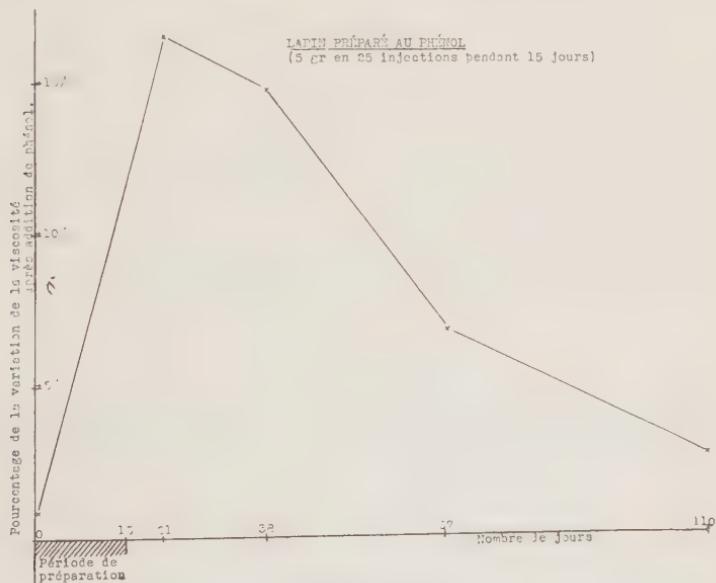
b) PERSISTANCE DE L'IMMUNITÉ. — Elle atteint plusieurs mois. Le tableau V reproduit les durées pendant lesquelles l'anticorps reste observable après une préparation par différents antigènes :

TABLEAU V. — Durée de la persistance de l'anticorps.

ANTIGÈNE

Lactate Na	≥ 124 jours.
Saccharose	≥ 242 jours.
Acide ascorbique	≥ 52 jours.
Glucosamine	≥ 166 jours.
Phénol	≥ 110 jours.
Hydroquinone	≥ 197 jours.
Véronal.	418 jours.

La courbe XII reproduit l'évolution du taux de l'anticorps chez un lapin préparé pendant vingt-trois jours par 4,8 g. de glucosamine. Ce taux reste encore notable après cent soixante-six jours.



Courbe XIII.
PERSISTANCE DE L'ANTICORPS.

Animal préparé pendant quinze jours par 25 injections intramusculaires de phénol (5 g. au total). L'anticorps décroît lentement et reste encore décelable après cent dix jours.

La courbe XIII est relative à un animal préparé pendant quinze jours par le phénol (5 g. au total). L'anticorps n'a pas encore disparu le cent-dixième jour.

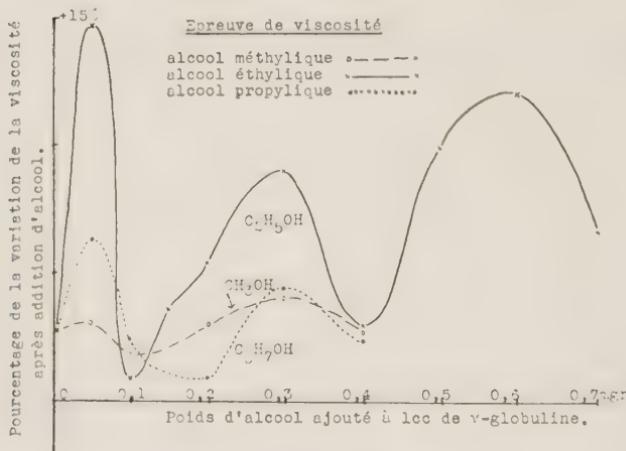
Nous verrons bientôt que cette persistance de l'anticorps peut être encore augmentée par l'effet des injections de rappel.

VI. — Spécificité de l'anticorps.

Pour le sérum total non purifié, il suffit de rappeler les exemples de spécificité qui ont été décrits précédemment (par exemple, la spécificité des sérum d'animaux respectivement préparés avec

LAPIN PRÉPARÉ PAR L'ALCOOL ÉTHYLIQUE

(140cc en 38 injections pendant 20 jours)

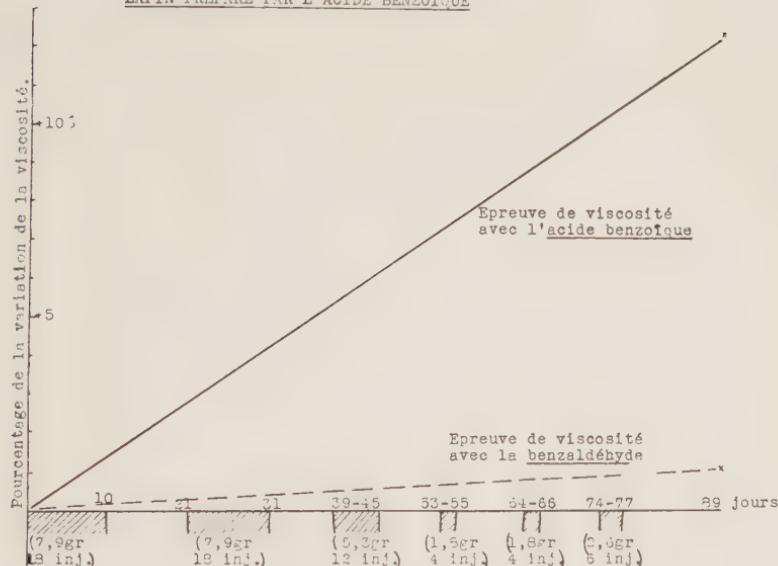


Courbe XIV.
SPÉCIFICITÉ DE L'ANTICORPS.

Lapin préparé pendant vingt jours par 38 injections d'éthanol (112 g. au total). Sérum prélevé le quatrième jour après la fin du traitement. L'épreuve de viscosité, pratiquée avec les alcools méthylique, éthylique et propylique, montre l'étroite spécificité de l'anticorps pour l'éthanol.

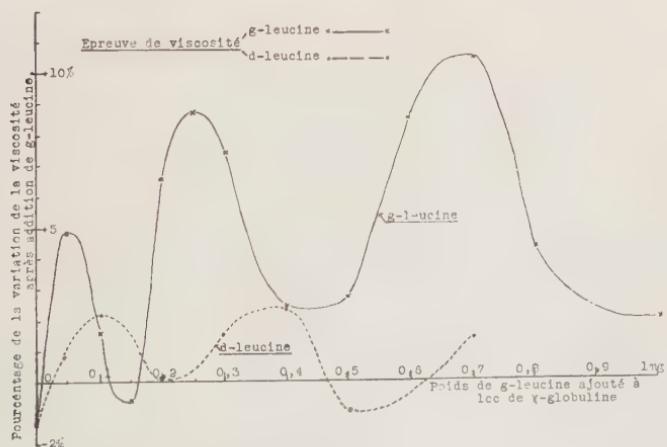
le xylose ou l'arabinose, avec l'acide *d*-tartrique, etc.). La même spécificité se retrouve quand on opère avec la γ -globuline.

La courbe XIV est relative à un lapin préparé pendant vingt jours par l'administration de 112 g. d'éthanol en 38 injections intramusculaires. L'épreuve de viscosité a été effectuée avec les alcools méthylique (courbe en tirets), éthylique (courbe en trait plein) et propylique (courbe en pointillé). On constate la spécificité remarquable de l'anticorps, bien que les alcools homologues, méthylique et propylique, ne diffèrent de l'antigène que par un groupe $-\text{CH}_2-$ en plus ou en moins, c'est-à-dire par une longueur de chaîne inférieure à 1,5 Å.

LAPIN PRÉPARÉ PAR L'ACIDE BENZOÏQUE

Courbe XV.

L'animal subit une longue préparation par l'acide benzoïque (2 séries d'injections préparantes et 4 injections de rappel). La γ -globuline est éprouvée au quatre-vingt-neuvième jour avec l'acide benzoïque et la benzaldéhyde. La spécificité est satisfaisante.

LAPIN PRÉPARÉ AVEC LA *g*-LEUCINE
(6 gr en 31 injections pendant 19 jours)

Courbe XVI.

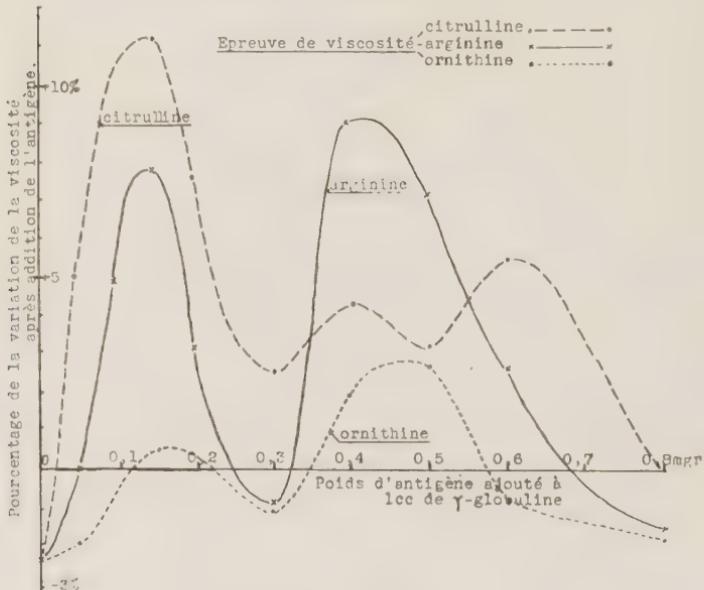
SPÉCIFICITÉ DE L'ANTICORPS.

Lapin préparé pendant dix-neuf jours par 38 injections de *g*-leucine (au total, 8 g.). L'épreuve de viscosité, pratiquée d'une part avec la *g*-leucine (courbe pleine) et, d'autre part, avec la *d*-leucine (courbe pointillée), révèle la spécificité de l'anticorps.

Il est à noter que, pour vérifier la précision des mesures, on a contrôlé les épreuves de viscosité par addition de 0,025 et 0,075 mg. d'éthanol. Les points obtenus ont encadré exactement le premier clocher de la courbe (obtenu par 0,05 mg. d'antigène).

La préparation d'un animal avec l'acide benzoïque permet d'observer (courbe XV) la spécificité remarquable de l'anticorps,

LAPIN PRÉPARÉ PAR L'ARGININE (base)
(8 gr en 31 injections pendant 18 jours)



Courbe XVII.
SPÉCIFICITÉ DE L'ANTICORPS.

Lapin préparé pendant dix-neuf jours par 31 injections d'arginine (8 g. au total). L'épreuve de viscosité est faite avec l'arginine, la citrulline et l'ornithine.

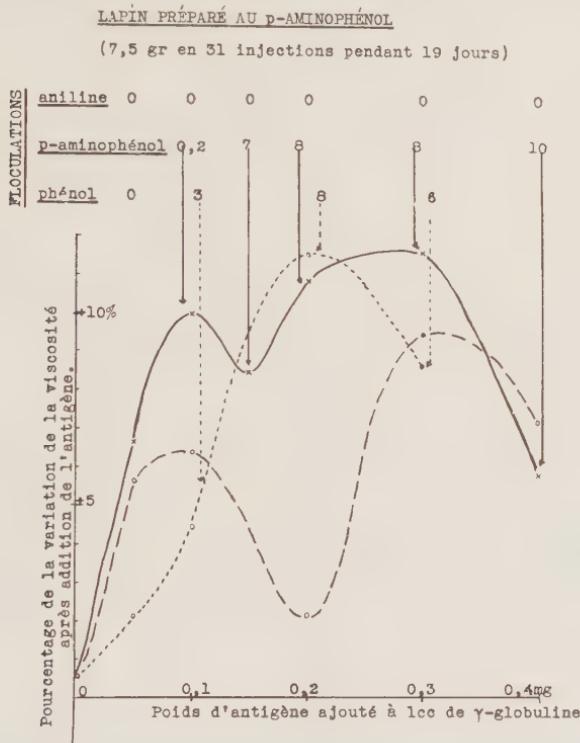
en l'éprouvant par l'acide benzoïque d'une part, et par la benzal-déhyde d'autre part.

La courbe XVI montre la spécificité de l'anticorps d'un lapin préparé par la *g*-leucine (courbe pleine) : le résultat de l'épreuve est beaucoup plus faible avec la *d*-leucine.

Pour l'arginine (courbe XVII), le résultat est moins satisfaisant. L'animal a été préparé pendant dix-neuf jours par 8 g. d'arginine, en 31 injections. La γ -globuline est éprouvée avec l'arginine, l'ornithine et la citrulline. L'écart de spécificité est satisfaisant entre l'arginine et l'ornithine. Mais, pour la citrulline, la courbe présente, dans le premier clocher, une augmentation supérieure à

celle de l'arginine. La présence de ces anomalies est l'indice que l'animal a été préparé avec une dose excessive d'antigène.

La courbe XVIII est relative à un animal préparé pour dix-neuf jours avec le *p*-aminophénol. La γ -globuline a été éprouvée avec le *p*-aminophénol, l'aniline et le phénol : le phénol donne une



Courbe XVIII.
SPÉCIFICITÉ DE L'ANTICORPS.

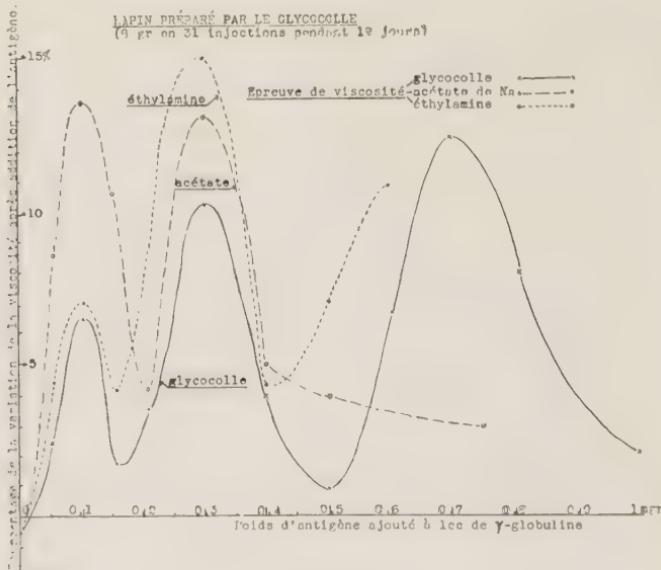
Lapin préparé, pendant dix-neuf jours, par 31 injections de *p*-aminophénol. L'épreuve de viscosité est faite avec le *p*-aminophénol (courbe pleine), le phénol (courbe pointillée) et l'aniline (courbe en tirets). L'optimum de flocculation se manifeste avec le *p*-aminophénol.

réaction comparable à l'antigène ; mais l'aniline est beaucoup moins active.

SPÉCIFICITÉS SINGULIÈRES. — On peut classer dans cette catégorie certains cas où la spécificité est en défaut par suite de la nature elle-même de l'antigène.

Le premier exemple est fourni par le glycocolle. Un lapin est préparé, pendant dix-neuf jours, par 8 g. de glycocolle, adminis-

très en 31 injections. Sa γ -globuline est éprouvée avec le glyco-colle, l'acétate de Na et l'éthylamine (courbe XIX) : l'épreuve montre, pour chacun de ces deux derniers corps, un résultat nettement plus important qu'avec le glycocolle. Or, ce résultat est intéressant, puisqu'il permet de vérifier — très indirectement d'ailleurs — la validité des théories proposées pour le mode de dissociation des acides aminés. On sait que deux théories ont



Courbe XIX

SPÉCIFICITÉ SINGULIÈRE DE L'ANTICORPS.

Lapin préparé, pendant dix-neuf jours, par 31 injections de glycocolle (8 g. au total). Le sérum donne une réponse positive, d'une part, avec le glycocolle et, d'autre part, avec l'acétate de Na et l'éthylamine. L'intensité de la réaction de viscosité est, pour chacun de ces deux corps, plus grande qu'avec le glycocolle, ceci en accord avec les valeurs respectives des pK . On remarque que les maxima sont localisés dans des zones superposables.

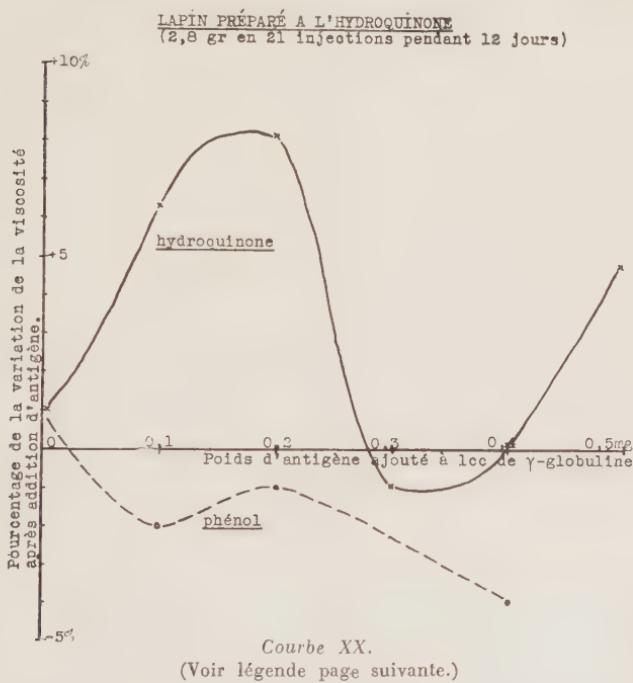
été proposées sur le mode de cette dissociation au point isoélectrique. Dans la théorie classique, la molécule serait neutre. Au contraire, la théorie du « Zwitterion » de Bjerrum — que d'autres considérations rendent plus acceptables — considère la molécule comme totalement dissociée. Le choix entre ces deux théories présente un intérêt considérable, puisqu'il aboutit à assigner, à la force des groupements acide et basique, des valeurs très différentes. La tableau VI présente, à côté de ces valeurs (K_a de la fonction acide), la valeur de l'acide acétique :

TABLEAU VI. — Force assignée à la fonction acide.

Glycocolle (théorie classique)	$K_a = 1,8 \cdot 10^{-10}$
Glycocolle (Zwitterion)	$3,9 \cdot 10^{-4}$
Acide acétique	$1,8 \cdot 10^{-5}$

Or, l'étroit parallélisme que l'on remarque sur la courbe XIX entre le glycocolle et l'acétate de Na conduit à assigner, à leurs pK_a des valeurs voisines, c'est-à-dire à considérer comme plus valable la théorie de Bjerrum que l'ancienne théorie classique.

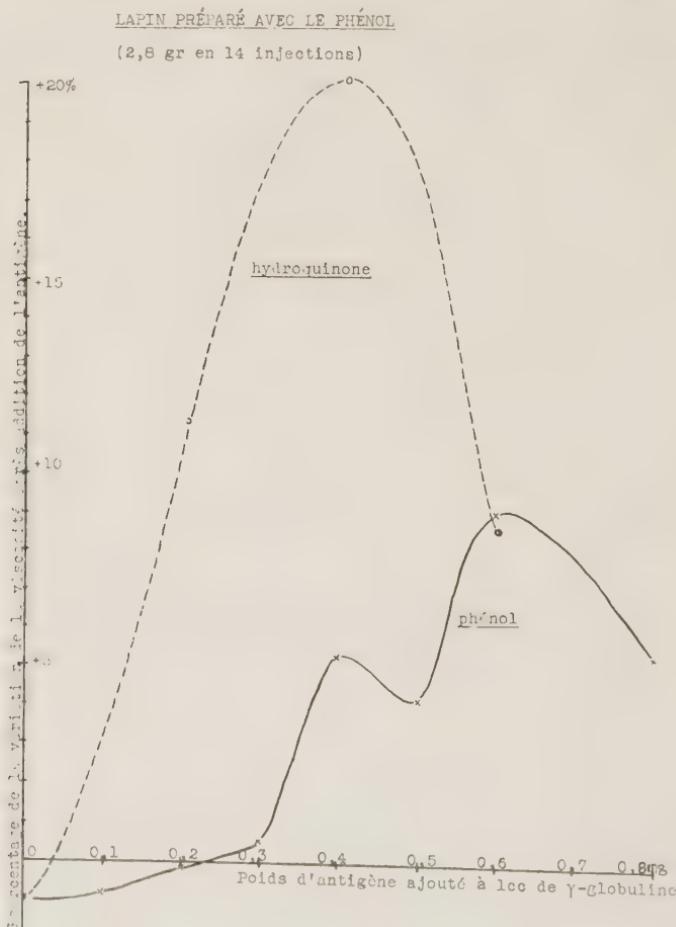
Voici un autre exemple de spécificité singulière. Deux lapins



sont préparés, l'un par l'hydroquinone (courbe XX), l'autre par le phénol (courbe XXI). Dans les deux cas, la γ -globuline est éprouvée avec le phénol et avec l'hydroquinone. On constate que le lapin préparé avec l'hydroquinone réagit exclusivement à l'hydroquinone, et nullement avec le phénol ; par contre, le lapin préparé avec le phénol réagit avec le phénol et, bien mieux encore, avec l'hydroquinone. Si l'on compare simplement les formules développées du phénol et de l'hydroquinone,



on peut donner l'interprétation immédiate suivante : l'anticorps préparé par l'hydroquinone ne peut réagir qu'avec 2 groupements oxy- en para ; inversement, l'anticorps, préparé avec le phénol, réagit encore mieux, si on offre, pour l'union de l'antigène et



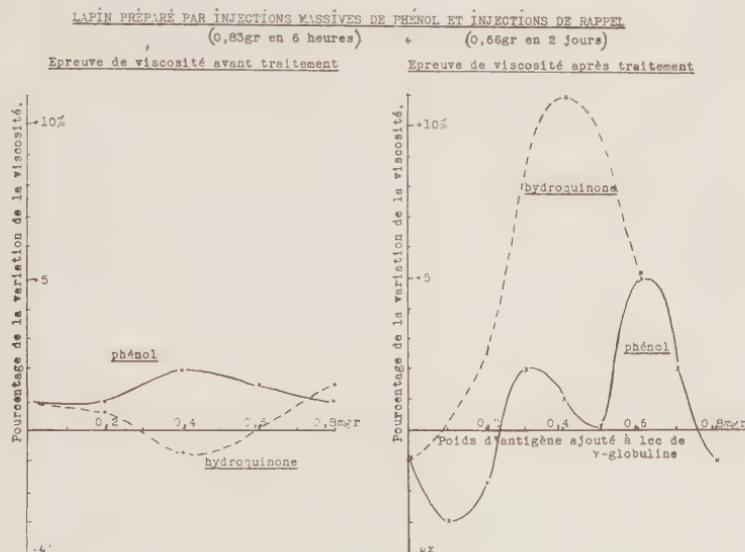
Courbe XXI.

SPÉCIFICITÉ SINGULIÈRE DE L'ANTICORPS

Courbe XX, lapin d'abord préparé pendant douze jours par 21 injections d'hydroquinone (2,8 g. au total), 1^{re} injection de rappel au trentième jour. Le cent vingt deuxième jour, le sérum réagit spécifiquement avec l'hydroquinone, mais reste négatif avec le phénol.

Courbe XXI, inversement, lapin préparé successivement par un traitement de 10 injections de phénol (2,8 g. au total) pendant cinq jours, puis par 1 injection de rappel au quinzième jour. Le sérum, prélevé le trentième jour, réagit avec le phénol, mais mieux encore avec l'hydroquinone.

de l'anticorps, deux groupes spécifiques au lieu d'un seul. L'existence de ces spécificités implique évidemment que l'anticorps trouve, entre des molécules homologues, des différences plus profondes que ne le laisse apparaître l'examen des formules schématiques. Par exemple, pour ces dernières spécificités inversement croisées entre le phénol et l'hydroquinone, voici l'interprétation que permet la mésométrie (4). La structure électronique des com-



Courbe XXII.

SPÉCIFICITÉ SINGULIÈRE DE L'ANTICORPS.

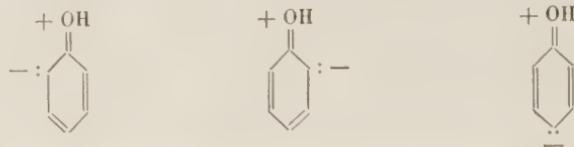
A droite, épreuve de viscosité sur l'animal neuf (non préparé), avec le phénol et l'hydroquinone. L'animal subit une préparation massive par le phénol (0,83 g. en six heures), suivie, six jours après, par 4 injections de rappel (0,66 g.).

A gauche, le sérum, prélevé six jours après, réagit avec le phénol, mais bien plus encore avec l'hydroquinone.

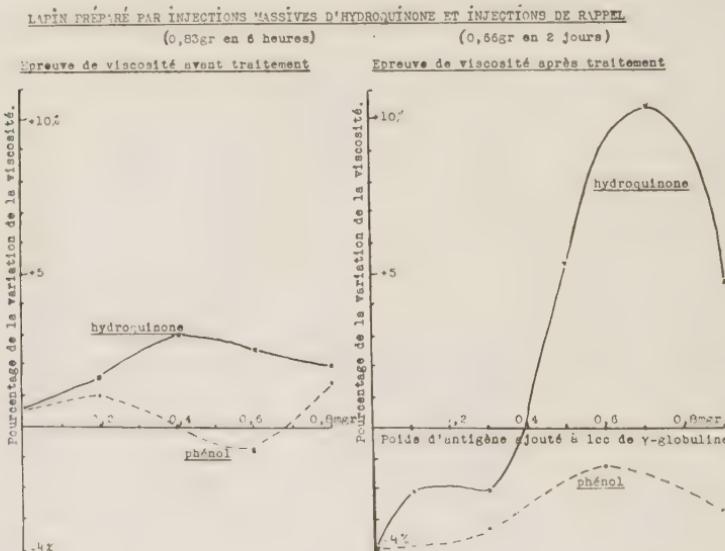
posés benzéniques est la résultante de la configuration propre du noyau benzénique et des perturbations provoquées dans cette configuration par les effets dus aux substituants. Pour le phénol, la perturbation provoquée par le substituant — OH se traduit par le fait que le doublet électronique libre, localisé sur l'oxygène, peut entrer en résonance avec les électrons π du cycle aromati-

(4) Je dois ces renseignements à M. B. PULLMAN, à qui je renouvelle mes remerciements.

tique. Ceci est représenté par les formes suivantes de la structure du phénol :



Ces perturbations sont localisées essentiellement sur les sommets



Curbe XXIII.

SPÉCIFICITÉ SINGULIÈRE DE L'ANTICORPS.

A droite, épreuve de viscosité, sur l'animal neuf (non préparé), avec l'hydroquinone et le phénol.

L'animal subit une préparation massive par l'hydroquinone (0,83 g. en six heures), suivie, quatre jours après, par 4 injections de rappel (0,66 g.).

À gauche, le sérum, prélevé six jours après, possède un anticorps spécifique de l'hydroquinone seule et ne réagissant pas avec le phénol.

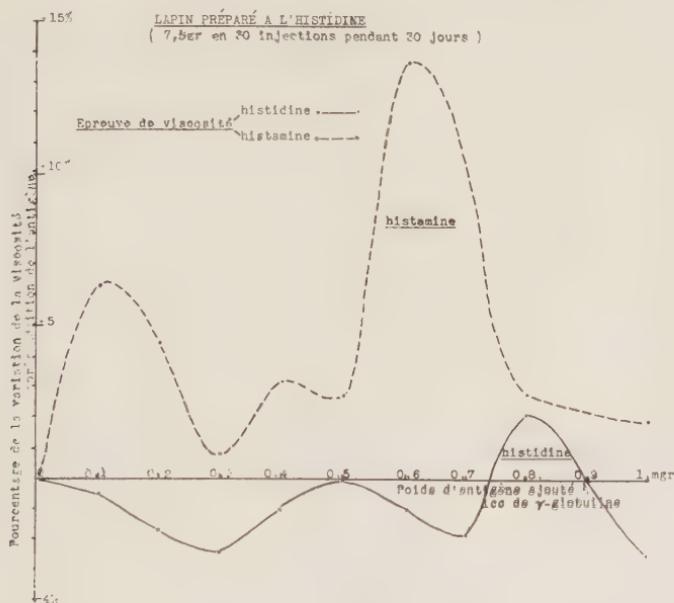
ortho et para, ce qui se traduit, pour eux, par une réactivité accrue.

Pour l'hydroquinone, le mécanisme de conjugaison des substituants avec le cycle est très analogue à ce qu'il est dans le phénol. En première approximation, on peut considérer que l'influence des 2 —OH en conjugaison simultanée est la somme de leur conjugaison séparée. Mais la distribution du nuage électronique entraîne des différences sensibles entre ces deux molécules : dans

l'hydroquinone, tous les sommets du noyau benzénique se trouvent activés, en faisant pratiquement disparaître les défauts de charge des sommets méta. D'autre part, l'hydroquinone possède également des liaisons C-C douées d'un indice (c'est-à-dire d'un caractère de double liaison) supérieur à celui des liaisons du phénol. On s'explique ainsi la réactivité plus élevée de l'hydroquinone.

Les courbes XXII et XXIII apportent la confirmation expérimentale de cette spécificité.

Un autre exemple de ces spécificités singulières est fourni par



Courbe XXIV.
SPÉCIFICITÉ SINGULIÈRE DE L'ANTICORPS.

Lapin préparé, pendant vingt jours, par 20 injections d'histidine (au total, 7,5 g.). Le serum de l'animal réagit faiblement avec l'histidine, mais très énergiquement avec l'histamine.

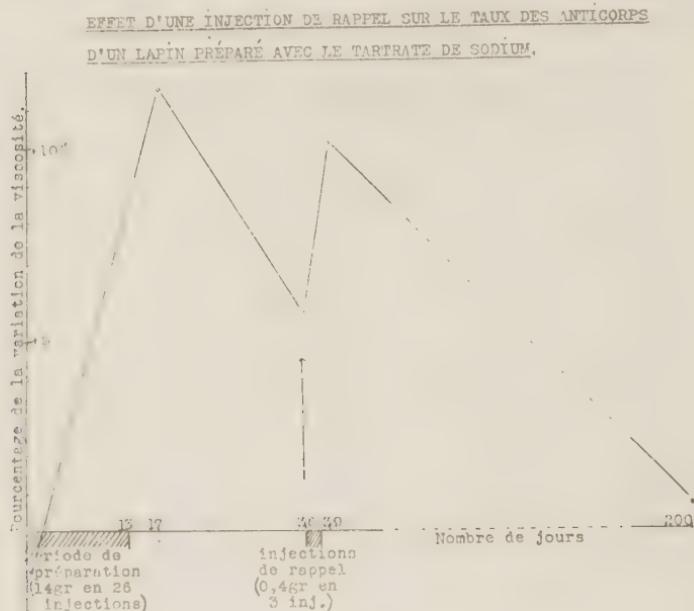
l'histamine. Un lapin est préparé à l'histidine (7,5 g. pendant vingt jours). Sa γ -globuline donne une réaction faible avec l'histidine (courbe XXIV), mais au contraire très intense avec l'histamine : le départ du groupe carboxyle favorise donc l'union de l'anticorps et de l'antigène. Néanmoins, cette γ -globuline ne possède aucun pouvoir de protection *in vivo* contre une injection d'histamine (5).

(5) Je remercie M. N.-B. HALPERN qui a bien voulu pratiquer cette épreuve sur le Lapin.

VII. -- Action des injections de rappel.

Comme pour les antigènes protéidiques, le taux de l'anticorps peut être relevé quand l'animal, laissé au repos pendant quelques semaines après la période initiale de préparation, subit à nouveau l'injection d'une faible dose d'antigène (6).

Par exemple, après une première préparation par le tartrate



Courbe XXV.

ACTION DES INJECTIONS DE RAPPEL.

Après une première période de préparation par le tartrate de Na (14 g. en 26 injections pendant treize jours), l'animal est laissé au repos pendant vingt-trois jours. A ce moment, 3 injections de tartrate (au total, 0,4 g.) pendant deux jours entraînent le relèvement du taux de l'anticorps.

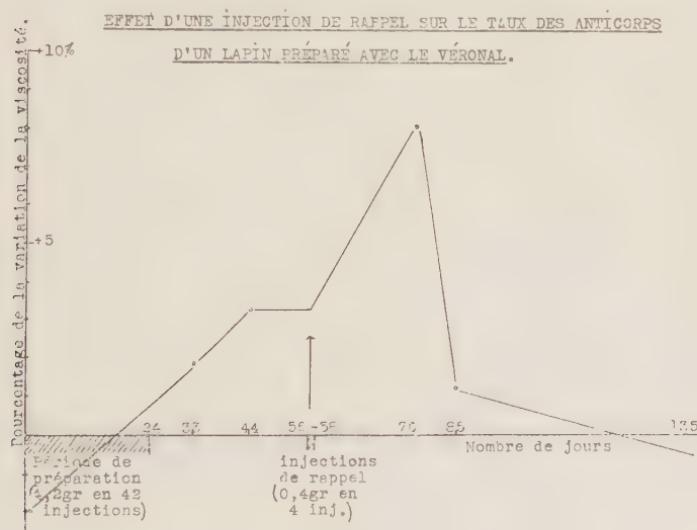
de Na (14 g. pendant treize jours), un lapin est laissé au repos pendant vingt-trois jours. Il subit alors trois nouvelles injections de tartrate à faible concentration (0,4 g. au total). La courbe XXV montre le relèvement immédiat du taux de l'anticorps.

L'expérience, répétée avec les antigènes les plus divers, donne un résultat constant. La courbe XXVI est relative à un animal préparé par le véronal : sous l'effet de l'injection de rappel, le

6) L'étude de cette question m'a été suggérée par M. R. WAHL, à qui j'adresse mes remerciements.

taux de l'anticorps dépasse celui qui avait été atteint lors de la préparation initiale.

Le tableau VII résume plusieurs expériences. On remarque, pour les sept premières expériences, que la concentration de l'antigène injecté dans le rappel est en moyenne dix fois plus faible que dans l'injection initiale. Là encore, nous retrouvons les conditions particulières, imposées par la taille et la diffusibilité de l'antigène. Pratiquement, il est préférable de traiter



Courbe XXVI.

ACTION DES INJECTIONS DE RAPEL.

Après une première période de préparation par le véronal (4,2 g. en 42 injections pendant vingt-quatre jours), l'animal est laissé au repos pendant trente-deux jours. A ce moment, 4 injections de véronal (0,4 g. au total) pendant deux jours entraînent un relèvement très marqué du taux de l'anticorps.

l'animal par 2 ou 4 injections, administrées pendant un ou deux jours et avec un poids total d'antigène égal au dixième de l'injection initiale. Ces doses sont néanmoins excessives. Pour déterminer la limite inférieure de la dose efficace, on peut comparer les n°s 8, 9, 10 et 11 du tableau VII. Ils sont relatifs à 4 lapins de même poids et ayant subi la même préparation initiale par le salicylate de Na. Ils sont soumis à des injections de rappel d'importances différentes. On constate que l'effet est encore sensible avec une injection de 75 mg., mais que le résultat le plus manifeste est consécutif à l'injection de 370 mg., soit une dose vingt-deux fois plus faible que la dose initiale.

TABLEAU VII. — Injections de rappel.

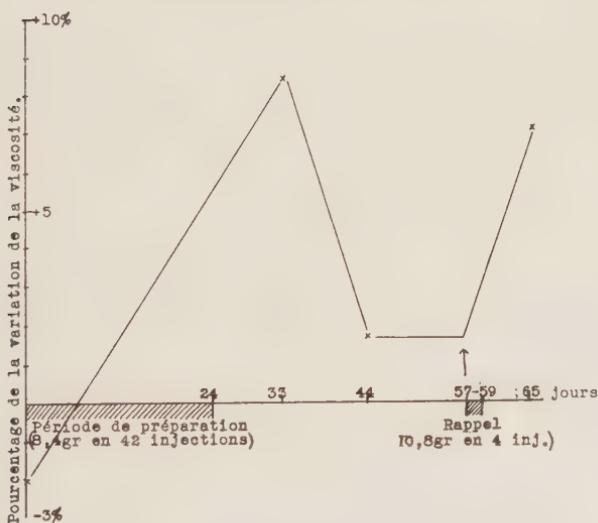
NUMERO	ANTIGÈNE	PRÉPARATION INITIALE DE L'ANIMAL			PÉRIODE DE REPOS			INJECTION DE RAPPEL			ADOUCIMENTATION consécutive p. 100	
		Nombre d'inspections en jours	Nombre d'inspections préparatoires en jours	Temps écoulé de la fin de la préparation jusqu'à l'injection en jours	Nombre d'adjonctions en jours	Temps du test de viscosité	Nombre d'adjonctions en jours	Temps du test de viscosité	Nombre d'adjonctions en jours	Temps du test de viscosité en grammes		
1	lactate	22	42	25	+ 6,8	23	+ 3	4	2,4	7	+ 8	+ 166
2	Saccharose.	43	26	46	+ 7,3	23	+ 7,3	3	0,37	3	+ 12,5	+ 57
3	Alanine.	43	26	5	+ 7,5	23	+ 5	2	0,3	4	+ 8	+ 60
4	Phénol.	22	42	8,4	+ 8,5	33	+ 4,7	4	0,8	7	+ 7,2	+ 323
5	Hydroquinone.	44	21	2,8	+ 9,3	18	+ 9,3	4	0,5	21	+ 11,7	+ 15
6	Tartrate.	43	26	14,4	+ 14,5	23	+ 5,8	3	0,37	2	+ 10	+ 72
7	Vétoral.	24	42	4,2	+ 3,2	33	+ 3,3	4	0,4	18	+ 8,4	+ 153
8	Salicylate de Na.	44	22	8,2	+ 4,9	12	+ 4,9	4	1,3	10	+ 9	+ 83
9	Salicylate de Na.	44	22	8,2	+ 3,4	12	+ 3,1	2	0,75	10	+ 6,8	+ 419
10	Salicylate de Na.	44	22	8,2	+ 2,7	12	+ 2,7	1	0,37	10	+ 7,2	+ 466
11	Salicylate de Na.	44	22	8,2	+ 6,4	12	+ 6,4	1	0,075	10	+ 8	+ 25

La courbe XXVII reproduit le résultat obtenu avec un animal préparé par le phénol.

TRAITEMENT PAR PLUSIEURS INJECTIONS DE RAPPEL SUCCESSIVES. — On peut administrer plusieurs injections de rappel successives et séparées par une période de plusieurs mois : on observe chaque fois un relèvement important du taux de l'anticorps.

La courbe XXVIII est relative à un animal préparé initiale-

EFFET D'UNE INJECTION DE RAPPEL SUR LE TAUX DES
ANTICORPS D'UN LAPIN PRÉPARÉ AVEC LE PHÉNOL.



Courbe XXVII.

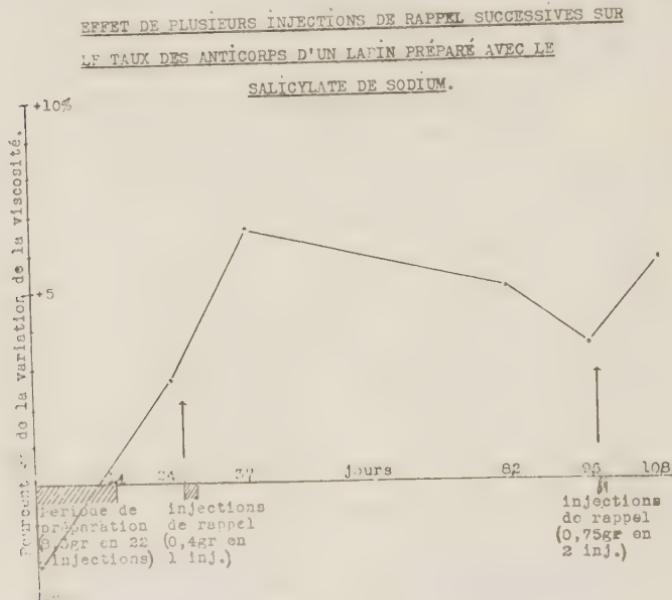
ACTION DES INJECTIONS DE RAPPEL.

Après une première période de préparation par le phénol (8,4 g. en 42 injections pendant vingt-six jours), l'animal est laissé au repos pendant trente-trois jours. A ce moment, 4 injections de phénol (0,8 g. au total) pendant deux jours entraînent le relèvement du taux de l'anticorps.

ment par 8,5 g. de salicylate de Na, administrés pendant quatorze jours. Dix jours après, on constate, après une première injection de rappel (0,4 g.), une ascension importante du taux de l'anticorps. Le quatre-vingt-seizième jour, ce taux présentait une diminution sensiblement égale à la moitié de sa valeur initiale : une nouvelle injection de rappel (0,75 g. en 2 injections) entraîne alors une augmentation de ce taux.

L'expérience avec l'hydroquinone donne un résultat encore plus probant (courbe XXIX). L'animal est d'abord préparé pendant treize jours par 2,8 g. d'antigène. Dix-huit jours après la

fin du traitement, on procède à une première injection de rappel (0,5 g. en 1 injection). Il en résulte une ascension très notable du taux de l'anticorps, taux qui va persister à une valeur élevée pendant cent quarante-quatre jours. Le cent quatre-vingt-cinquième jour, on procède à une seconde injection de rappel qui



Courbe XXVIII.

ACTION DE 2 INJECTIONS DE RAPPEL SUCCESSIONS.

Après une première période de préparation par le salicylate de Na (8,3 g. en 22 injections pendant quatorze jours), l'animal subit deux séries d'injections de rappel : la première après dix jours, la seconde après quatre-vingt-seize jours. On observe chaque fois l'augmentation du taux de l'anticorps,

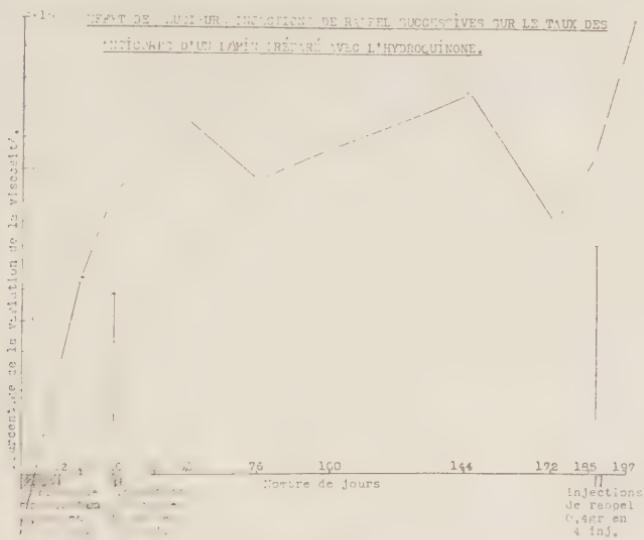
relève le taux de l'anticorps à une valeur qui n'avait jamais été atteinte.

NOUVELLE MÉTHODE DE PRÉPARATION DE L'ANIMAL PAR COMBINAISON D'UN TRAITEMENT MASSIF ET D'UNE INJECTION DE RAPPEL. — Il résulte des faits précédents que l'on peut mettre à profit l'action des injections de rappel pour la combiner avec un court traitement massif : on dispose ainsi d'une nouvelle méthode de préparation des animaux, méthode qui est applicable dans tous les cas où l'antigène est atoxique et permet des injections massives.

La courbe XXX reproduit l'évolution du taux des anticorps d'un lapin préparé par cette technique : il a d'abord subi, le premier jour, l'administration de 1,2 g. de phénol (en 6 injec-

tions pendant quatre heures). Les cinquième et sixième jours, on injecte à nouveau 0,8 g. de phénol en 4 injections. Le taux de l'anticorps augmente progressivement jusqu'au vingtième jour.

Cette méthode est surtout utile quand il est nécessaire d'obtenir une préparation rapide des animaux. La courbe XXXI montre



Courbe XXXI.

ACTION DE 2 INJECTIONS DE RAPPEL SUCCESSIVES.

Après une première période de préparation par l'hydroquinone (2,8 g. en 21 injections pendant douze jours), l'animal subit deux séries d'injections de rappel : la première après dix-huit jours, la seconde après cent quatre-vingt-cinq jours. On observe chaque fois l'augmentation du taux de l'anticorps.

que l'on peut ainsi obtenir en quinze jours un taux important d'un anticorps nicotinique.

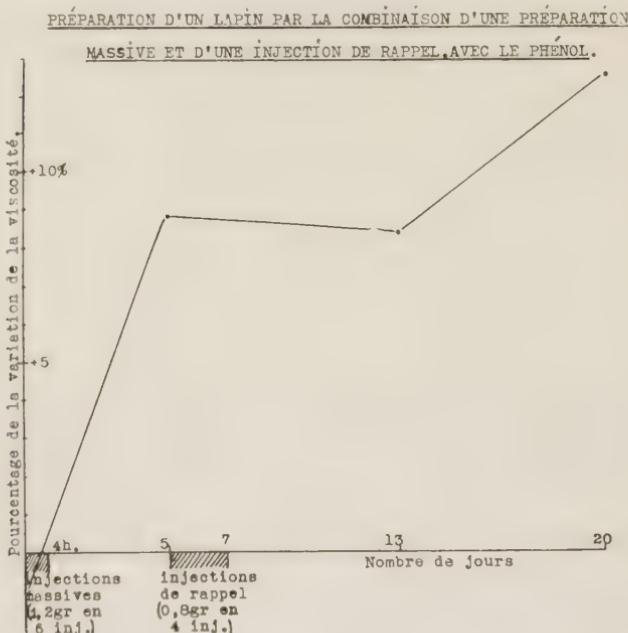
Nous allons constater maintenant que les injections de rappel peuvent être efficaces pour faire apparaître le pouvoir flocculant.

VIII. — Le pouvoir flocculant.

Quand on opère avec la γ -globuline, le pouvoir flocculant devient une règle générale, à l'exception de quelques rares antigènes (lactate de Na, glycocolle, acide nicotinique, véronal) ; il est en général peu marqué et peut même se borner à une opalescence.

Cette flocculation visible offre le grand intérêt de confirmer, avec l'une des techniques essentielles de l'immunoologie classique les résultats qui n'étaient obtenus jusqu'ici que par des mesures physico-chimiques.

Quand on opère avec le sérum total, le pouvoir floculant est exceptionnel, comme on l'a déjà indiqué [courbe IV (c)], par suite de l'action protectrice exercée par la masse de ses constituants inactifs. Au contraire, avec la γ -globuline, on constate la flocculation avec des antigènes légers, tels que l'éthanol, l'acétate de Na ou le saccharose. On a déjà eu l'occasion de rencontrer l'apparition de la flocculation, dès qu'on a opéré avec la γ -globu-



Courbe XXX.

PRÉPARATION PAR INJECTIONS MASSIVES SUIVIES D'INJECTIONS DE RAPPEL.

L'animal subit, le premier jour, une préparation massive par injection de 1,2 g. de phénol en 6 injections. Les cinquième et sixième jours, on pratique les injections de rappel (0,8 g. de phénol en 4 injections). Vers le vingtième jour, l'anticorps a atteint un taux élevé.

line [courbes VIII, IX, XI, XIII, XVIII]. Voici un autre exemple caractéristique de l'apparition du pouvoir floculant dès que l'on opère par la γ -globuline. Un lapin est préparé par la mono-éthylamine (courbe XXXII). La réaction de viscosité, à peine sensible sur le sérum total, est, au contraire, très positive sur la γ -globuline et s'accompagne constamment de flocculation.

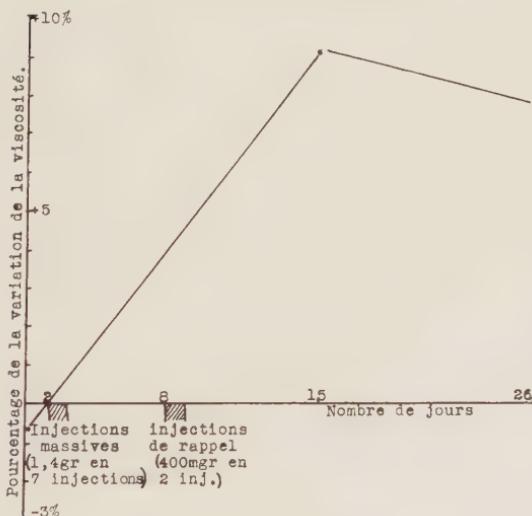
INFLUENCE DE LA NATURE DE L'ANTIGÈNE. — Tout d'abord, le poids moléculaire de l'antigène ne fixe par lui-même aucune

limite inférieure au pouvoir floculant, puisque l'on observe des flocculations avec l'éthanol et l'acétate de Na.

1^o Les antigènes monovalents (C_2H_5OH , CH_3CO_2Na , C_6H_5OH) provoquent l'apparition d'anticorps doués d'un pouvoir floculant presque constant.

2^o Pour les antigènes à fonction multiple, le pouvoir floculant est inversement proportionnel à la dissociation de ces fonctions :

PRÉPARATION D'UN LAPIN PAR LA COMBINAISON D'UNE
PRÉPARATION MASSIVE ET D'UNE INJECTION DE RAPPEL
AVEC L'ACIDE NICOTINIQUE.



Courbe XXXI.

PRÉPARATION PAR INJECTIONS MASSIVES SUIVIES D'INJECTIONS DE RAPPEL.

L'animal subit, le premier jour, une préparation massive par injection de 1,4 g. d'acide nicotinique en 7 injections. Le huitième jour, on pratique les injections de rappel ((0,4 g. d'acide nicotinique en 2 injections). Le quinzième jour, l'anticorps atteint un taux élevé.

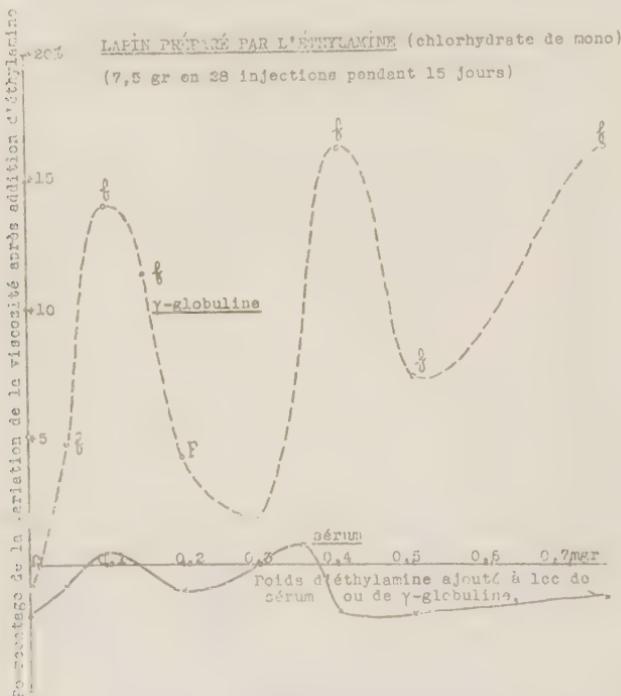
il est relativement élevé pour les sucres, nul — ou à peine marqué — pour les acides aminés.

OBSERVATIONS DES FLOCULATIONS. — Deux conditions sont requises pour l'obtention de ces flocculations : une agitation, lente et prolongée pendant quelques minutes, des mélanges de γ -globuline et d'antigène, un séjour de quelques heures à l'étuve à 45°. Pratiquement, dès la fin de l'épreuve de viscosité, le mélange expérimenté est transvasé dans un tube à hémolyse bouché et

porté à l'étuve : la rotation du viscosimètre a assuré une agitation convenable du mélange.

La flocculation apparaît, en général, après quelques heures. Dans les cas les plus favorables, on peut la constater dès la sortie du viscosimètre.

Les flocculations sont notées selon l'échelle arbitraire suivante : De 0,1 à 0,5, opalescence croissante, sans flocculation ;



Courbe XXII.
FLOCCULATION OBSERVÉE AVEC LA γ -GLOBULINE.

Animal préparé pendant quinze jours par 28 injections de chlorhydrate de mono éthylamine (7,5 g. au total). Saignée le cinquième jour après la fin du traitement. L'épreuve de viscosité est effectuée en double, sur le sérum total, non purifié, et sur la γ -globuline. On note, sur les courbes, que la réaction est non seulement beaucoup plus intense avec la γ -globuline, mais aussi qu'elle est accompagnée par la flocculation.

De 0,6 à 0,9, précipité floconneux très léger, n'ayant pas sédiménté après une heure ;

De 1 à 10, flocculat rassemblé au fond du tube.

Sur les courbes, on a figuré, soit la notation précédente, soit les lettres *f* (de 0,1 à 0,9) ou *F* (de 1 à 10).

Il est évidemment plus satisfaisant de mesurer au photomètre la densité optique des solutions.

Par exemple, un lapin est préparé avec le raffinose par un traitement massif prolongé pendant quatre heures (au total 6,4 g.). En opérant sur le sérum total, on constate l'apparition de flocculations dont les maxima correspondent à ceux de l'épreuve de viscosité (tableau VIII) :

TABLEAU VIII. — **Densité optique des mélanges de sérum et de raffinose (lapin préparé avec la raffinose).**

POIDS DE RAFFINOSE ajouté à 1 cm ³ de sérum	DENSITÉ OPTIQUE
0 mg...	0,0938
0,1 mg...	0,0940
0,2 mg...	0,0968 (1 ^{er} maximum de viscosité).
0,3 mg...	0,0938
0,4 mg...	0,0946 (2 ^e maximum de viscosité).
0,5 mg...	0,0928
0,6 mg...	0,0928
0,7 mg...	0,0953 (3 ^e maximum de viscosité).
0,8 mg...	0,0935

Voici un deuxième exemple (tableau IX) où les mesures portent sur la γ -globuline d'un lapin préparé avec l'acétate de Na (8,3 g. en quinze jours).

TABLEAU IX. — **Densité optique des mélanges de γ -globuline et d'acétate de Na (lapin préparé par l'acétate de Na).**

POIDS D'ACÉTATE ajouté à 1 cm ³ de γ -globuline	DENSITÉ OPTIQUE
0 mg...	0,0762
0,2 mg...	0,0500
0,4 mg...	0,0498
0,6 mg...	0,0498 (maximum de viscosité).
0,8 mg...	0,0512

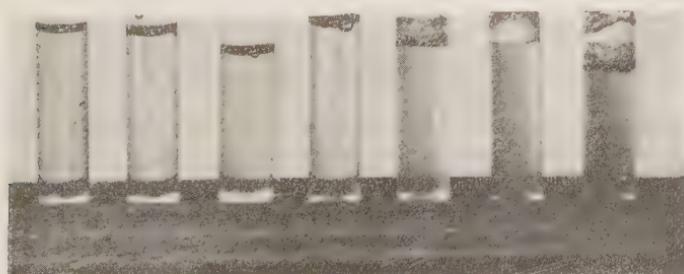
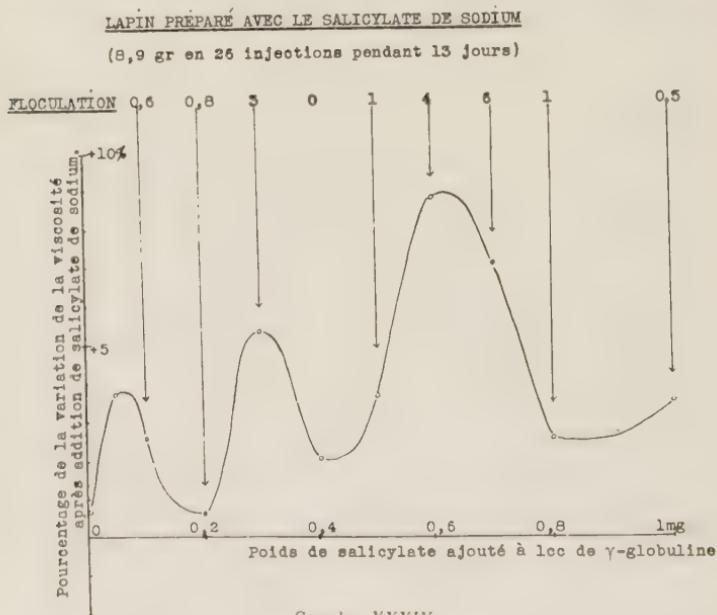


Photo XXXIII.

FLOCCULATION DE LA γ -GLOBULINE PAR L'ACÉTATE DE Na.

Ces flocculations sont également représentées par la photographie XXXIII.

INTERVENTION DU FACTEUR INDIVIDUEL. — Quand on opère avec des antigènes protéïdiques, l'obtention d'un sérum floulant chez le lapin se heurte fréquemment à l'intervention du facteur individuel de l'animal. Il n'est pas étonnant de retrouver ici une irrégularité comparable. Ces réactions individuelles, peu génantes



Course XXXIV.

RELATIONS ENTRE LES MAXIMA DE VISCOSITÉ ET LES ZONES DE FLOCULATION.

Animal préparé pendant treize jours par 26 injections de salicylate de Na (8,9 g. au total). On note la correspondance entre les maxima de viscosité et de flocculation.

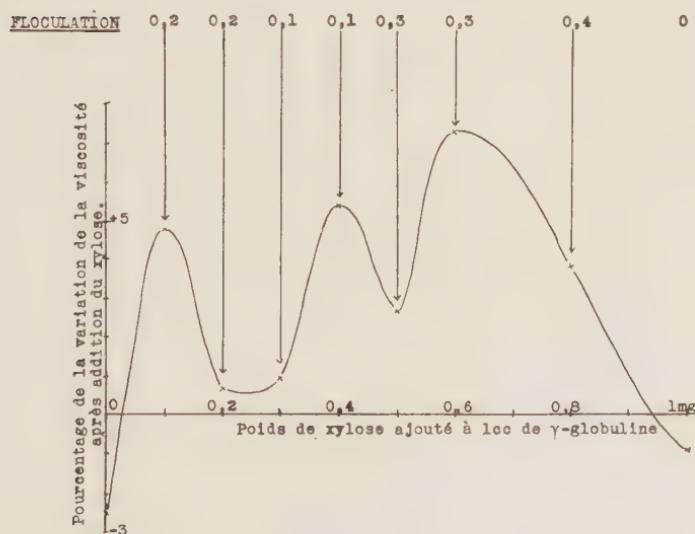
quand il s'agit du test de viscosité, ont ici un intérêt primordial, puisqu'il s'agit du « tout ou rien ».

Par exemple, 3 lapins (d'un poids moyen de 2 kg.) subissent, pendant vingt-cinq jours, la même préparation par le tartrate de Na (21 g. en 39 injections). Sur les 3 γ -globulines, prélevées dix jours après la fin du traitement, 1 seule possède un pouvoir flocant manifeste (valeur = 1); c'est également celle qui, à l'épreuve de viscosité, donne la réaction la plus forte. Il est à noter qu'après un repos de vingt quatre jours, la γ -globuline de l'un de ces 2 animaux négatifs a manifesté à son tour un léger pouvoir flocant.

CONCORDANCE DES INDICATIONS DE LA FLOCULATION ET DE LA VISCOSITÉ. — L'intérêt principal de ces floculations est leur concordance avec les maxima de viscosité. Un des aspects les plus surprenants de l'épreuve de viscosité est la succession de plusieurs zones d'équivalence (3 en général), très rapprochées, mais nettement délimitées : la flocculation confirme l'existence de ces zones multiples, qui sont particulières aux antigènes de très faible poids moléculaire ; en général, la flocculation la plus intense se

LAPIN PRÉPARÉ AVEC LE XYLOSE

(8,4 gr en 26 injections pendant 13 jours)



Curve XXXV.
(Voir légende page suivante.)

manifeste dans la zone d'équivalence relative à la plus forte concentration en antigène. Ce fait s'observe bien sur les courbes XXXIV et XXXVI.

Nota. — Dans le cas où les floculations sont de très faible importance (valeur 0,6 à 0,9), on observe parfois que le maximum de flocculation ne coïncide pas exactement avec le maximum de viscosité.

INFLUENCE DU MODE ET DU DEGRÉ DE PRÉPARATION DE L'ANIMAL. — En général, la flocculation ne se manifeste que pendant une période relativement courte de la préparation de l'animal. D'autre part,

le mode lui-même de la préparation est le facteur le plus important.

La préparation massive ne s'accompagne que très rarement du pouvoir floulant. Voici pourtant l'une des expériences positives qui présente l'avantage de constituer un schéma parfait des

LAPIN PRÉPARÉ AVEC L'ACÉTATE DE SODIUM

(6,8 gr en 26 injections pendant 13 jours)

Courbe XXXVI.

RELATIONS ENTRE LES MAXIMA DE VISCOSITÉ ET LES ZONES DE FLOCULATION.

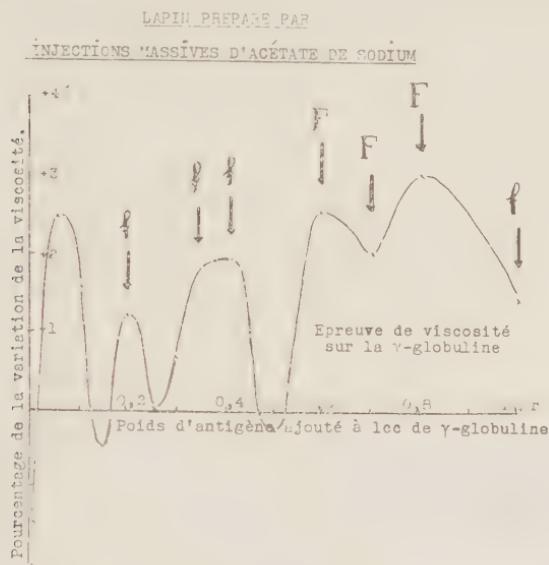
Les lapins sont préparés pendant treize jours par 26 injections : xylose (8,4 g.) d'une part (courbe XXXV), acétate de Na (6,8 g.) d'autre part (courbe XXXVI).

Les courbes de viscosité sont accompagnées de la valeur de l'intensité des flocculations observées. On note, sur la courbe XXXVI, un accord remarquable entre les maxima de la viscosité et ceux de la flocculation.

considérations précédentes (courbe XXXVII). Un lapin subit, pendant quatre heures, 10 injections d'acétate de Na (0,5 g.). Le test de viscosité révèle, pour sa γ -globuline (prise de sang le quatrième jour), 5 maxima successifs. Aucune flocculation n'apparaît au premier clocher. Les deuxième et troisième clochers présentent une très légère flocculation. La flocculation devient au contraire massive aux quatrième et cinquième clochers, c'est-à-dire

précisément pour ceux qui correspondent aux zones d'équivalence nécessitant la plus grande concentration d'antigène. On note constamment un accord parfait entre les indications de la viscosité et de la flocculation.

En général, la flocculation apparaît pendant une période assez courte. Par exemple, chez un lapin préparé pendant vingt-cinq jours par 21 g. de tartrate de Na (courbe (XXXVIII), le pouvoir



Courbe XXXVII.

FLOCCULATION APPARAISSANT APRÈS PRÉPARATION MASSIVE.

Un lapin subit, pendant quatre heures, 10 injections d'acétate de Na (0,5 g.). La γ -globuline, prélevée le quatrième jour, floccule en présence de l'antigène et cette flocculation reste localisée dans les zones d'équivalence correspondant aux maxima de viscosité.

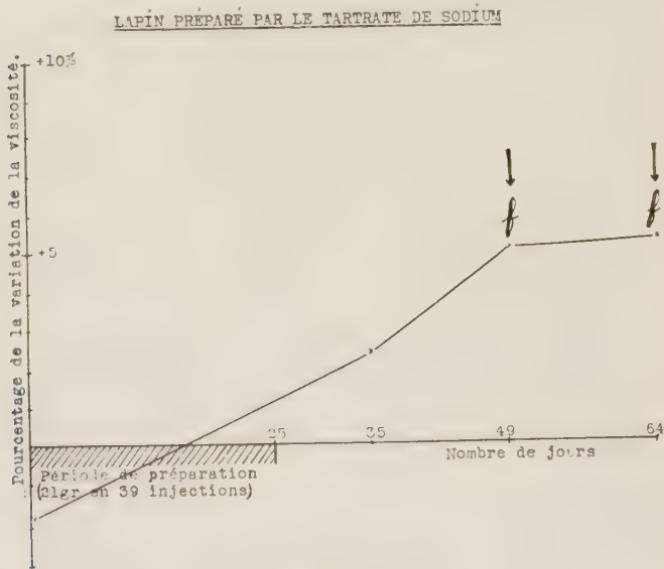
floculant n'apparaît qu'entre les quarante-neuvième et soixante-quatrième jours.

Les injections de rappel agissent souvent sur le pouvoir floculant, soit qu'elles permettent son apparition, soit qu'elles la prolongent. Un échec ne se rencontre qu'avec de rares antigènes. La courbe XXXIX est un de ces exemples. Il s'agit d'un animal préparé au lactate de Na. Bien que cet antigène n'entraîne presque jamais l'apparition du pouvoir floculant, on constate, pour cet animal, un léger pouvoir floculant aux trente-troisième et quarante-quatrième jours. On pouvait alors essayer d'augmenter l'intensité de cette flocculation par une injection de rappel. Or, la réaction de viscosité a augmenté, mais le pouvoir floculant a

disparu. Finalement, le pouvoir flocculant s'est manifesté au début de la formation de l'anticorps et n'est plus réapparu, malgré l'injection de rappel.

Par contre, avec le saccharose (courbe XL), le pouvoir flocculant apparaît dès la fin de la préparation initiale et se maintient, grâce à une injection de rappel, jusqu'au deux cent quarante-deuxième jour.

Avec la *d-l* alanine (courbe XLI), le pouvoir flocculant n'apparaît



Courbe XXXVIII.

FLOCUATION DE LA γ -GLOBULINE AVEC SON ANTIGÈNE.

Lapin préparé, pendant vingt-cinq jours, par 39 injections de tartrate de Na (21 g. au total). Le pouvoir flocculant apparaît tardivement, le quarante-neuvième jour.

— et encore seulement très légèrement — qu'après une injection de rappel. Quand le poids moléculaire de l'antigène augmente, le pouvoir flocculant apparaît avec beaucoup de régularité. Avec l'acide déshydro-doisynolique (P. M. 1.283), le pouvoir flocculant apparaît d'une façon si intense qu'il rend impossibles les mesures de viscosité. Avec la streptomycine (courbe XLII), le pouvoir flocculant apparaît pendant tout le cours de la préparation (avant et après l'injection de rappel).

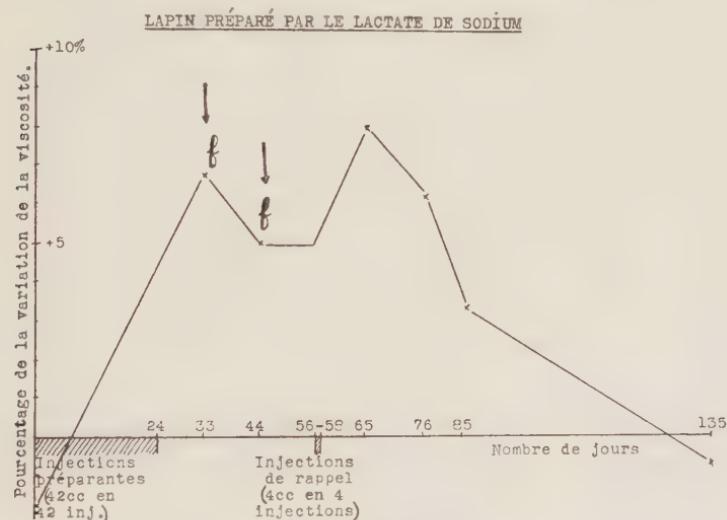
Enfin, l'injection de rappel est généralement nécessaire si l'animal a été soumis à un court traitement massif. La courbe XLIII montre ainsi l'apparition très momentanée du pouvoir flo-

culant chez un animal soumis à un traitement massif par le phénol et à une injection de rappel.

On peut résumer les relations entre la flocculation et l'épreuve de viscosité en classant les antigènes en trois groupes :

a) La flocculation accompagne constamment le résultat positif de l'épreuve de viscosité (cas du saccharose) ;

b) La flocculation apparaît précocement et disparaît rapidement, bien que la viscosité reste élevée (cas de l'acide ascorbique, de



Courbe XXXIX.

ACTION DES INJECTIONS DE RAPPEL.

Après une première période de préparation par le lactate de Na (16,8 g. en 12 injections pendant vingt-quatre jours), l'animal est laissé au repos pendant trente-deux jours. Il subit à ce moment 4 injections pendant deux jours (au total, 1,6 g. d'antigène). Le taux de ses anticorps se relève immédiatement en dépassant même le taux atteint lors de la préparation initiale. Mais l'injection de rappel reste sans effet sur le pouvoir flocculant.

la glucosamine, du lactate de Na et, fréquemment aussi, du phénol) ;

c) La flocculation apparaît très tardivement (cas de lalanine, du tartrate de Na, du salicylate de Na, de la streptomycine).

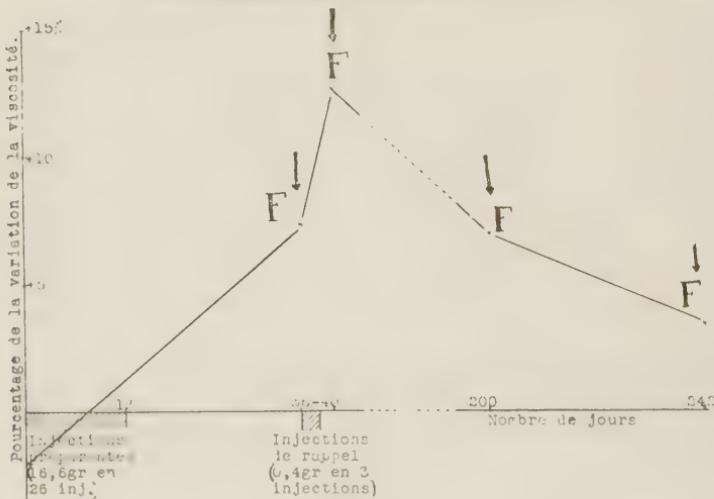
SPÉCIFICITÉ DE LA FLOCCULATION. — La spécificité de la flocculation est parfois satisfaisante. En se reportant à la courbe XVIII (animal préparé avec le *p*-aminophénol), on constate que la flocculation est intense avec le *p*-aminophénol, moins forte avec le phénol et nulle avec l'aniline.

Mais la spécificité est souvent en défaut. Par exemple, après

une préparation prolongée avec une dose massive d'éthanol, la flocculation est plus intense avec l'alcool éthylique qu'avec l'alcool méthylique, ce qui est satisfaisant. Par contre, l'alcool propyle entraîne une flocculation légèrement plus marquée. L'épreuve de viscosité se révèle plus précise, puisqu'elle montre la spécificité étroite de l'anticorps (courbe XV).

Voici un autre exemple : après préparation par la *g*-leucine, on note avec la *g*-leucine une très légère opalescence, nulle au

LAPIN PRÉPARÉ PAR LE SACCHAROSE



Courbe XL.

FLOCCULATION DE LA γ -GLOBULINE AVEC SON ANTIGÈNE.

Lapin préparé d'abord pendant treize jours par 26 injections de saccharose (16,6 g. au total), puis par des injections de rappel pratiquées vingt-trois jours après la préparation initiale. Le pouvoir flocculant apparaît dès le début de la préparation et se manifeste encore, d'une façon très marquée, le deux cent quarante-deuxième jour.

contraire avec la *d*-leucine. Néanmoins, l'opalescence est plus marquée avec la *d*-alanine.

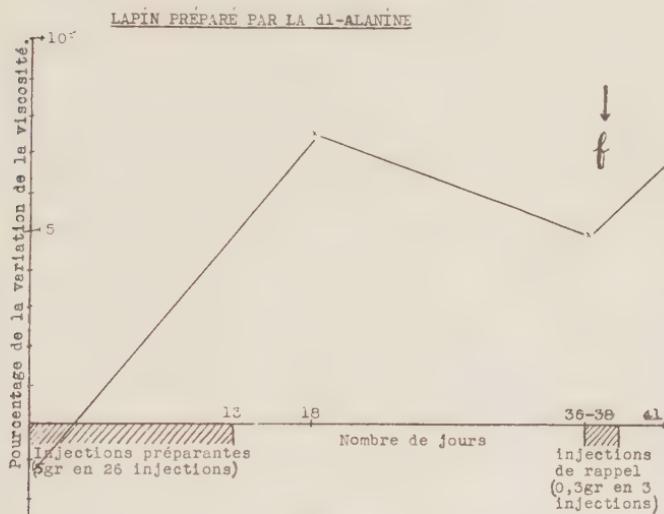
Parfois encore, les écarts de spécificité sont plus graves : un lapin préparé au xylose a fourni une γ -globuline qui ne flocculait pas avec le xylose, mais, au contraire, avec l'arabinose.

Il en résulte que, si l'on compare la valeur des tests de flocculation et de viscosité, la spécificité est mise en évidence d'une façon bien plus étroite par l'épreuve de viscosité, et avec l'avantage supplémentaire d'indiquer simultanément l'intensité de la combinaison de l'antigène avec l'anticorps.

Enfin, la comparaison d'animaux préparés avec des doses différentes d'un même antigène montre, d'une façon presque absolue, que l'augmentation de la dose entraîne la diminution de la spécificité.

En résumé, le pouvoir flocculant peut apparaître avec la plupart des antigènes. Il a les caractères suivants :

1° *Les flocculations sont, en général, très discrètes et n'appa-*



Courbe XLI.

FLOCULATION DE LA γ -GLOBULINE AVEC SON ANTIGÈNE.

Lapin préparé, d'abord pendant treize jours par 26 injections de *dl*-alanine (5 g. au total), puis par des injections de rappel pratiquées vingt-trois jours après la préparation initiale. Le pouvoir flocculant apparaît tardivement, le quarante et unième jour.

raissent que plusieurs heures après le mélange de l'antigène et de l'anticorps ;

2° *Les zones de flocculation se superposent avec les zones d'équivalence indiquées par le test de viscosité ;*

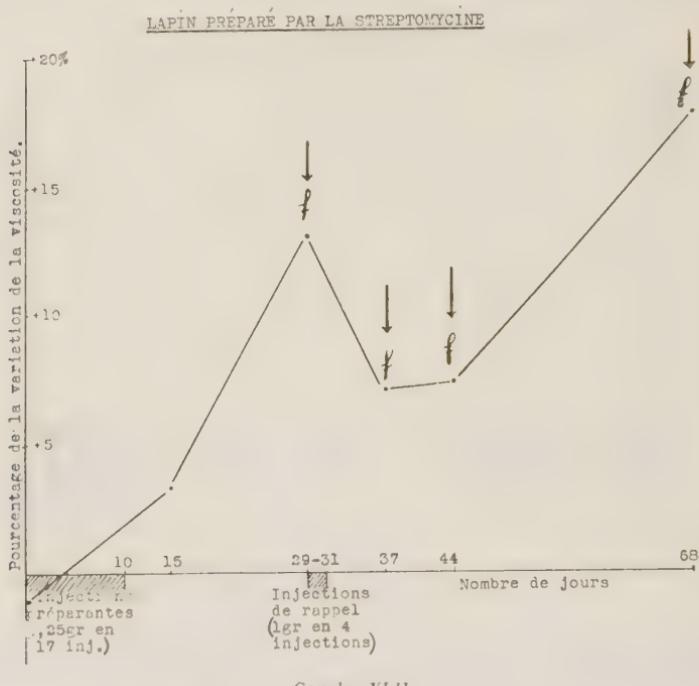
3° *La réaction individuelle des animaux devient ici un facteur important ;*

4° *L'intensité du pouvoir flocculant augmente avec le poids moléculaire de l'antigène ;*

5° *La spécificité de la flocculation est moins satisfaisante que celle de l'épreuve de viscosité, qui constitue ainsi une « échelle d'observation » de qualité supérieure.*

IX. — Réaction de l'anneau.

Malgré sa faible intensité et son inconstance, la réaction de l'anneau constitue une preuve supplémentaire de l'existence de l'anticorps. Comme on le sait, la réaction s'effectue en introduisant dans un tube mince 1 cm³ du sérum étudié et en le recouvrant,



Courbe XLII.

FLOCULATION DE LA γ -GLOBULINE.

Lapin préparé, d'abord pendant dix jours, par 17 injections de streptomycine (1,5 g. au total), puis par des injections de rappel pratiquées dix-neuf jours après la préparation initiale. Le pouvoir flocculant apparaît le vingt-neuvième jour et persiste.

avec précaution, de 1 cm³ de l'antigène en solution à 2,5 p. 1.000 dans NaCl 7 p. 1.000 à pH = 7,4. Le tube est placé à l'étuve à 45° et on observe toutes les trente minutes. L'anneau apparaît dans les trois heures consécutives. Il est fugace et disparaît rapidement après quelques heures, par suite de la diffusion.

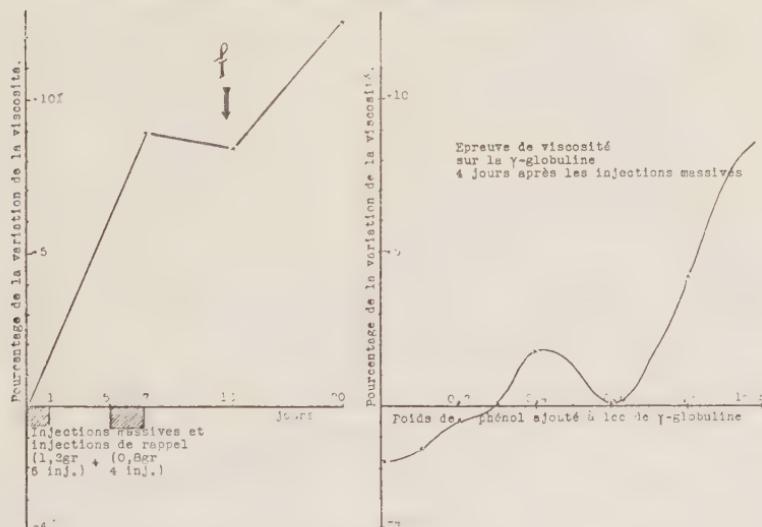
L'histoire des anneaux est, dans ses grandes lignes, superposable à celle de la flocculation. Leur intensité dépend de la dose

d'antigène utilisée dans la préparation de l'animal, de la nature chimique de l'antigène et, surtout, du poids moléculaire de ce dernier.

TABLEAU X. — Réaction de l'anneau après préparation avec l'éthanol.

PRÉPARATION DE L'ANIMAL			RÉACTION de l'anneau
Durée	Poids total d'alcool injecté	Nombre total d'injections	
13 jours.	2,9 g.	26	Très légère.
20 jours.	112 g.	38	Positive.

LAEIN PRÉPARÉ PAR INJECTIONS MASSIVES DE PHENOL ET INJECTIONS DE RAPPEL



Course XLIII.

APPARITION DE LA FLOCULATION APRÈS TRAITEMENT MASSIF ET INJECTION DE RAPPEL.

Après une première préparation massive par le phénol, la γ -globuline, prélevée le cinquième jour, donne une réaction de viscosité positive (courbe de droite), mais est dépourvue du pouvoir flocculant. Des injections de rappel, pratiquées les cinquième et sixième jours, font apparaître, au treizième jour, le pouvoir flocculant. Ce dernier a disparu le vingtième jour.

Les tableaux X et XI font ressortir l'influence de la dose d'antigène administrée lors de la préparation de l'animal :

TABLEAU XI. — Réaction de l'anneau après préparation avec l'acétate de Na.

PRÉPARATION DE L'ANIMAL			RÉACTION de l'anneau
Durée	Poids total d'acétate injecté	Nombre total d'injections	
13 jours.	44 g.	26	Faible et diffuse.
13 jours.	44 g.	26	Légère.
25 jours.	39 g.	39	Très nette.

La réaction est, en général, très faible. Certains antigènes ne provoquent jamais, comme il ressort du tableau XII :

TABLEAU XII. — Influence de la nature de l'antigène sur la réaction de l'anneau.

ANTIGÈNES donnant une réaction positive	ANTIGÈNES donnant une réaction nulle
Saccharose.	Ethylamine.
Raffinose.	Glycocolle.
Acétate Na.	Leucine.
Tartrate Na.	Arginine.
Phthalate Na.	Glucosamine.
Acide doisynolique.	Salicylate Na.
Streptomycine.	

L'intensité de la réaction de l'anneau augmente avec l'élévation du poids moléculaire : l'acide doisynolique et la streptomycine provoquent la formation d'anneaux importants.

Le tableau XIII permet de vérifier cette action du poids moléculaire soit sur des sucres, soit sur des acides aminés :

TABLEAU XIII. — Influence du P. M. de l'antigène sur la réaction de l'anneau.

PRÉPARATION DE L'ANIMAL			RÉACTION de l'anneau
Antigène	Durée de la préparation en jours	Poids total d'antigène injecté en grammes	
Xylose.	15	8,4	A peine sensible.
Saccharose.	15	30	Faiblement positive.
Raffinose.	15	26	Très nette.
Glycocolle.	49	8	Nulle.
<i>o</i> -leucine.	19	8	Nulle.
<i>dl</i> -alanine.	43	4,95	A peine perceptible.
<i>dl</i> -phényl-alanine.	43	8,25	Faiblement positive.

En résumé, la réaction de l'anneau est fréquente, mais, en général, à peine marquée. Elle constitue plutôt un indice de l'existence du pouvoir antigène des molécules de faible poids moléculaire. Son intérêt principal réside dans ses relations avec l'intensité de la préparation et le poids moléculaire de l'antigène.

X. Préparation d'un même animal par plusieurs antigènes.

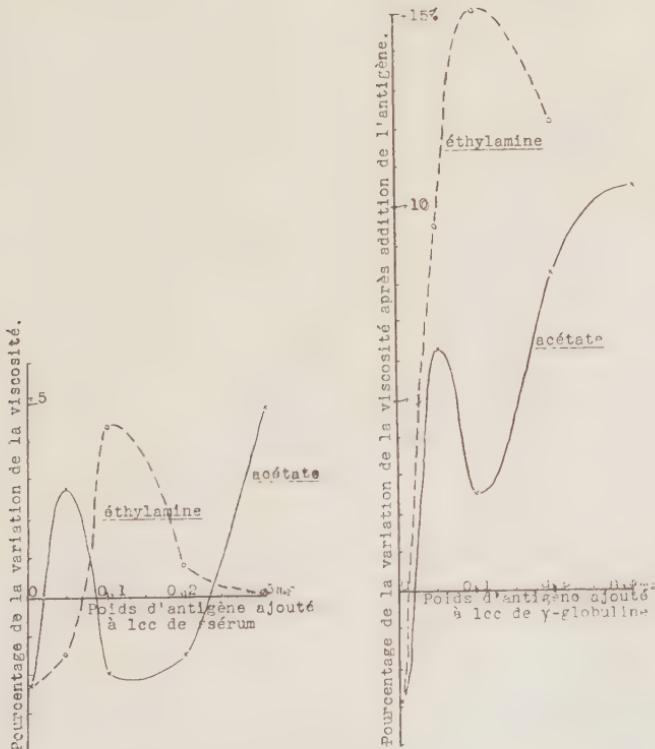
Jusqu'à maintenant, nous avons considéré la préparation de l'animal par un seul antigène. L'expérience montre la facilité

LAPIN PRÉPARÉ AVEC $\{4,8 \text{ gr d'acétate Na} + 5,3 \text{ gr d'éthylamine}\}$ en 21 injections pendant 13 jours

COMPARAISON DE L'ÉPREUVE DE VISCOSITÉ

sur le sérum

sur la γ -globuline



Courbe XLIV.

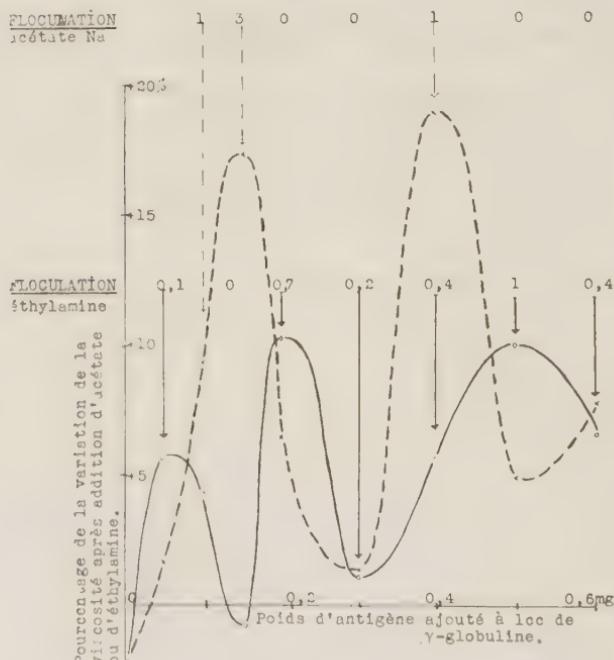
PRÉPARATION PAR DEUX ANTIGÈNES « SIMULTANÉS ».

Animal préparé, pendant treize jours, par 21 injections du mélange de deux antigènes (4,8 g. d'acétate de Na + 5,3 g. d'éthylamine). L'épreuve de viscosité est effectuée avec chacun des deux antigènes sur le sérum total non purifié (à droite) et sur la γ -globuline (à gauche).

extrême avec laquelle on peut préparer le même animal avec plusieurs antigènes, soit simultanément, soit successivement.

a) PRÉPARATION D'UN MÊME ANIMAL PAR PLUSIEURS ANTIGÈNES SIMULTANÉS. — L'animal est préparé comme précédemment, mais

LAPIN PRÉPARÉ AVEC { 7 gr de PHTALATE ACIDE DE K
{ 8 gr de MONO-ETHYLAMINE
(en 30 injections pendant 17 jours)



Courbe XLV.

PRÉPARATION PAR DEUX ANTIGÈNES « SIMULTANÉS ».

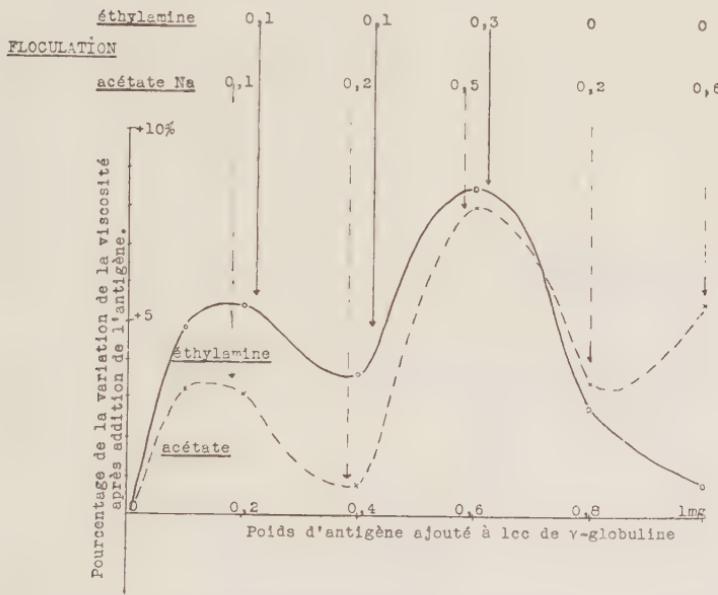
Lapin préparé, pendant dix-sept jours, par 30 injections du mélange (7 g. phthalate acide de K + 8 g. éthylamine). La γ -globuline réagit avec chacun des antigènes et flocule dans les maxima de viscosité.

en injectant le mélange des antigènes. A la fin de la préparation, les différentes techniques de recherche de l'anticorps (sur le sérum total, réaction de l'anneau ; sur la γ -globuline, épreuve de viscosité et observation des floculations) sont pratiquées avec chacun des deux antigènes séparément. La difficulté expérimentale réside dans l'importance de la quantité de sang qui doit être prélevée, ce qui impose d'opérer avec deux antigènes seulement. Parfois

même, quand l'état de l'animal s'oppose à une prise de sang trop volumineuse, on ne peut étudier que l'un des deux anticorps seulement.

On constate toujours la répétition des faits précédents, mais qui vont maintenant s'appliquer à chacun des deux antigènes injectés. Tout d'abord, les anticorps sont localisés dans la γ -globuline.

LAPIN PRÉPARÉ AVEC { 6,6 gr d'ACÉTATE DE SODIUM
{ 7,5 gr d'ÉTHYLAMINE
(en 28 injections pendant 15 jours)



PRÉPARATION PAR DEUX ANTIGÈNES « SIMULTANÉS ».

Lapin préparé, pendant quinze jours, par 28 injections du mélange (6 g. acétate de Na + 7,5 g. éthylamine). La γ -globuline réagit avec chacun des deux antigènes. On observe de légères floculations dans les maxima de viscosité.

Un lapin est préparé pendant treize jours par 21 injections de mélange (4,8 g. d'acétate de Na + 5,3 g. d'éthylamine). L'épreuve de viscosité est faite en double, sur le sérum total et sur la γ -globuline (courbe XLIV). On constate que le sérum répond spécifiquement à chacun des deux antigènes, mais que la réaction de viscosité est beaucoup plus intense avec la γ -globuline. Il est intéressant de noter, sur cette courbe et sur les suivantes, que les zones d'équivalence relatives à chaque antigène ne sont pas confondues.

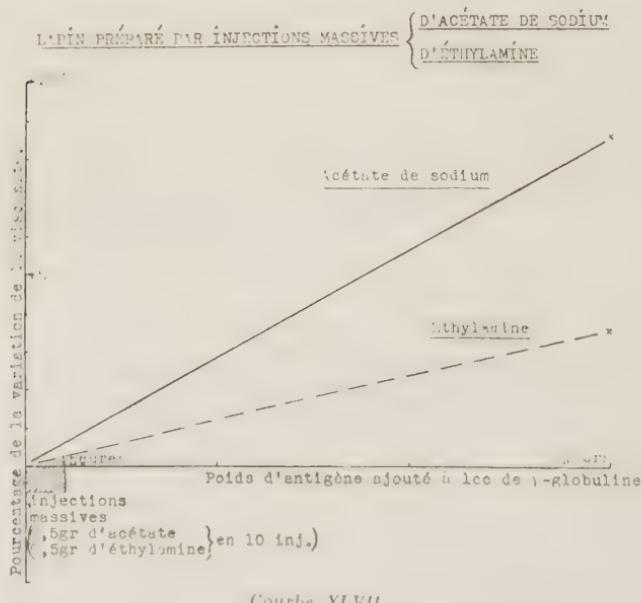
Les floculations que l'on observe restent en général localisées dans les zones d'équivalence fixées par l'épreuve de viscosité, comme il ressort de l'examen des courbes XLV et XLVI relatives à des lapins préparés avec des mélanges soit de phthalate de K et d'éthylamine, soit d'acétate de Na et d'éthylamine. Le tableau XIV reproduit l'ensemble de ces expériences :

TABLEAU XIV. — Préparation de lapins par 2 antigènes simultanés.

NUMÉRO

1	Xylose + éthylamine.
2	Ethanol + acétate Na.
3	Acétate + éthylamine (courbes XLIV et XLVI).
4	Benzoate + éthylamine.
5	Benzoate + aniline.
6	Salicylate + éthylamine.
7	Phthalate + éthylamine (courbe XLV).
8	Phthalate + <i>p</i> -phénylénediamine.

Il est à noter que l'injection d'antigènes de polarités inverses n'ont pas été marquées dans le mélange (phthalate + *p*-phénylène diamine).



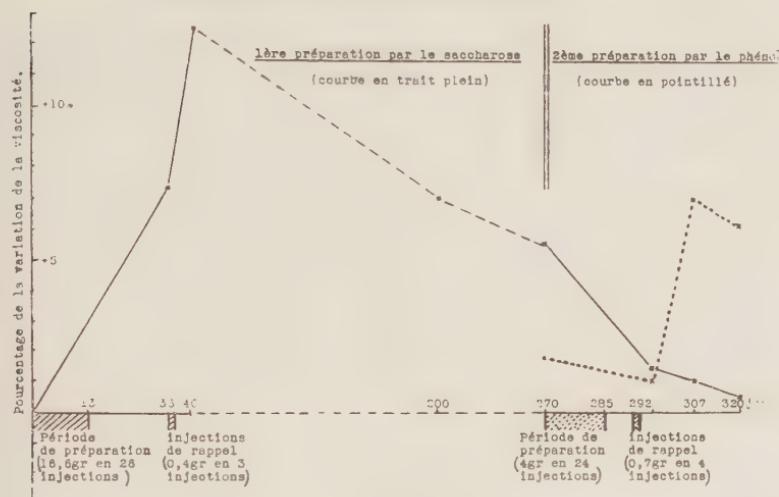
PRÉPARATION MASSIVE PAR DEUX ANTIGÈNES « SIMULTANÉS ».

Un lapin subit, pendant quatre heures, 10 injections d'un mélange d'acétate de Na (0,5 g.) et d'éthylamine (0,5 g.). La γ-globuline, prélevée le sixième jour réagit avec chacun des deux antigènes.

n'entraîne aucune synergie ou augmentation de l'importance des flocculations : chacun des antigènes agit comme s'il était injecté isolément.

Comme avec les antigènes simples, les flocculations restent inconstantes et dépendent du facteur individuel. L'augmentation de la durée et des doses employées dans la préparation entraîne l'augmentation de la flocculation et de la réaction de viscosité. Il

PRÉPARATION D'UN LAPIN PAR DEUX ANTIGÈNES SUCCESSIFS



Curbe XLVIII.

PRÉPARATION PAR DEUX ANTIGÈNES « SUCCESSIFS ».

L'animal subit une première période de préparation par 17 g. de saccharose pendant trente-cinq jours. Après deux cent soixante-dix jours, le taux de l'anticorps est encore notable. On procède alors à une nouvelle préparation par 4,7 g. de phénol pendant vingt-deux jours. A la fin de l'injection de rappel, le taux de l'anticorps-phénol atteint une valeur notable, tandis que l'anticorps-saccharose a subi une disparition presque totale.

en est de même pour la réaction de l'anneau. Par exemple, après une préparation durant vingt-quatre jours avec le mélange (84 g. d'éthanol + 15,75 g. d'acétate de Na), la réaction de l'anneau est très nette, d'une part, avec l'alcool et, d'autre part, avec l'acétate.

Toutes les méthodes précédemment décrites peuvent être utilisées pour la préparation de l'animal. La courbe XLVII reproduit le résultat obtenu avec une préparation massive, durant quatre heures, par 10 injections du mélange (0,5 g. acétate de Na + 0,5 g. éthylamine).

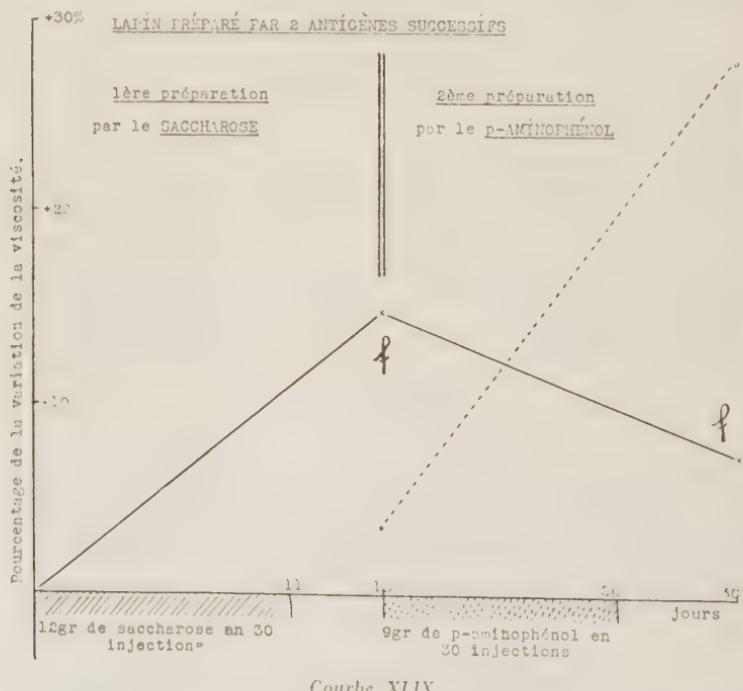
Notons encore que la spécificité est parfois en défaut. L'animal

préparé avec le mélange (xylose + éthylamine) donne une réaction positive avec l'arabinose.

Jusque-là, le résultat n'est pas surprenant, puisque nous savons que l'organisme fabrique des anticorps correspondant à des antigènes protéïdiques contenant un nombre fonctions chimiques autrement plus important que celui du mélange de deux antigènes de faible poids moléculaire.

On constate un résultat analogue quand on prépare un animal par deux antigènes successivement.

b) PRÉPARATION D'UN MÊME ANIMAL PAR PLUSIEURS ANTIGÈNES SUCCESSIFS. — Après une première période de préparation par



PRÉPARATION PAR DEUX ANTIGÈNES « SUCCESSIFS ».

Première préparation par 12 g. de saccharose pendant onze jours ; prise de sang quatre jours après. Le même jour, on entreprend la deuxième préparation de l'animal avec 9 g. de *p*-amino-phénol pendant onze jours ; prise de sang cinq jours après.

un antigène quelconque, l'animal est laissé au repos pendant une durée plus ou moins prolongée. Il subit alors une deuxième pré-

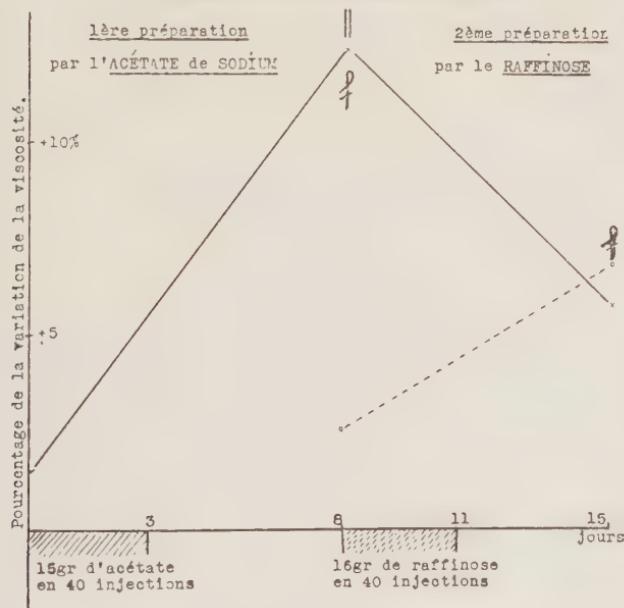
paration par un antigène différent. On constate que les choses se passent comme s'il s'agissait d'un animal neuf.

Le tableau XV résume l'ensemble des expériences :

TABLEAU XV. — **Antigènes injectés successivement à un même animal.**

PREMIER ANTIGÈNE	PÉRIODE SÉPARANT les deux préparations	DEUXIÈME ANTIGÈNE
Glucosamine	143 jours.	Phénol.
Saccharose	204 jours.	Phénol (courbe XLVIII).
Saccharose	4 jours.	P-aminophénol (courbe XLIX).
Acétate	6 jours.	Raffinose (courbes L et LI).
Acétate	4 jours.	Phénol (courbe LH).
Benzoate	22 jours.	Acétate (courbe LIII).
Histidine	42 jours.	Acétate.

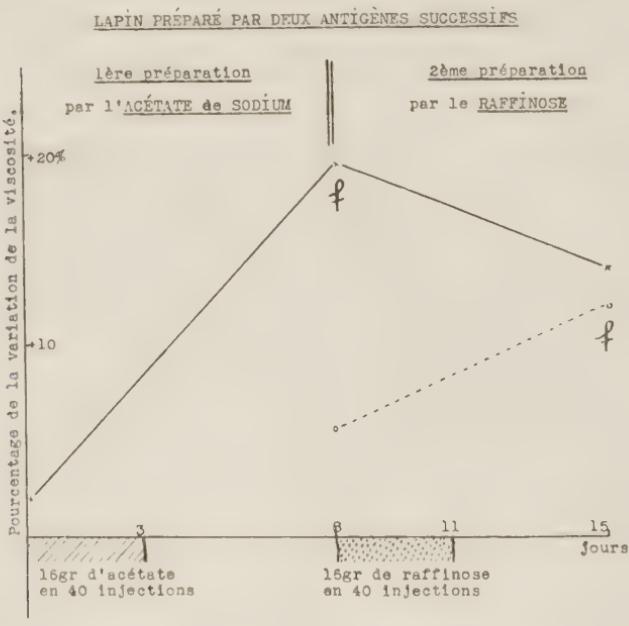
LAPIN PRÉPARÉ PAR DEUX ANTIGÈNES SUCCESSIFS



Courbe L.
(Voir légende page suivante.)

Ce groupe d'expériences offre un intérêt particulier, car on aurait pu rencontrer parfois la présence de réactions anamnés-

iques (relèvement du taux de l'anticorps consécutivement à l'injection d'une substance non spécifique). L'ensemble des courbes montre qu'au contraire, la nouvelle préparation accélère la régression de l'anticorps initial : *tout se passe comme si la même substance sert à former le substrat de l'anticorps, substrat par-*



Courbe LI.

PRÉPARATIONS MASSIVES PAR DEUX ANTIGÈNES SUCCESSIFS.

Les deux courbes reproduisent le résultat de la même expérience faite sur 2 animaux différents.

Première préparation massive par 16 g. d'acétate de Na administrés pendant trois jours en 40 injections. Prises de sang après cinq jours de repos. Ce même jour, commence la deuxième préparation massive avec 16 g. de raffinose, administrés pendant trois jours en 40 injections. Prise de sang après un repos de cinq jours.

Le rapprochement de ces deux expériences montre la constance et l'automatique de la formation de l'anticorps. La chute rapide du premier anticorps, dès que commence la deuxième préparation, évoque la locution familière *un clou chasse l'autre*.

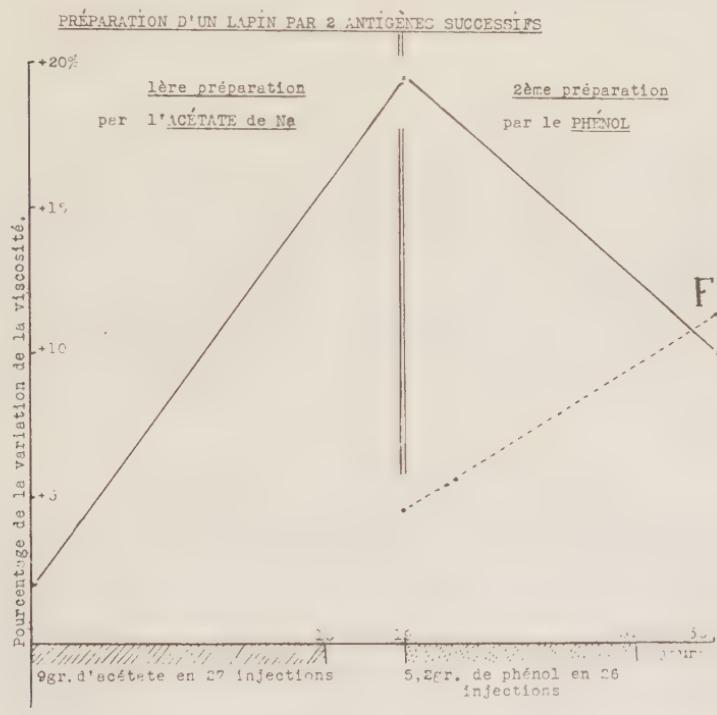
On notera encore les apparitions et disparitions successives du pouvoir flocculant

faiblement docile et qui oriente indifféremment sa spécificité vers le dernier antigène qui lui est proposé.

Il convient pourtant de remarquer que la réaction anamnestique ne met en jeu qu'une très faible quantité de l'antigène non spécifique, tandis que, dans les expériences considérées ici, la

quantité du deuxième antigène est, au contraire, considérable

Cette possibilité de préparer un animal avec deux antigènes successifs de faible poids moléculaire constitue la première différence que nous rencontrons vis-à-vis des antigènes protéidiques. On peut, pour ces derniers, se baser sur la production des sérums thérapeutiques. Or, les chevaux qui ont déjà été utilisés à la production d'un sérum antitoxique donné et qui sont réformés en raison de la baisse du taux des anticorps de leur sérum sont,

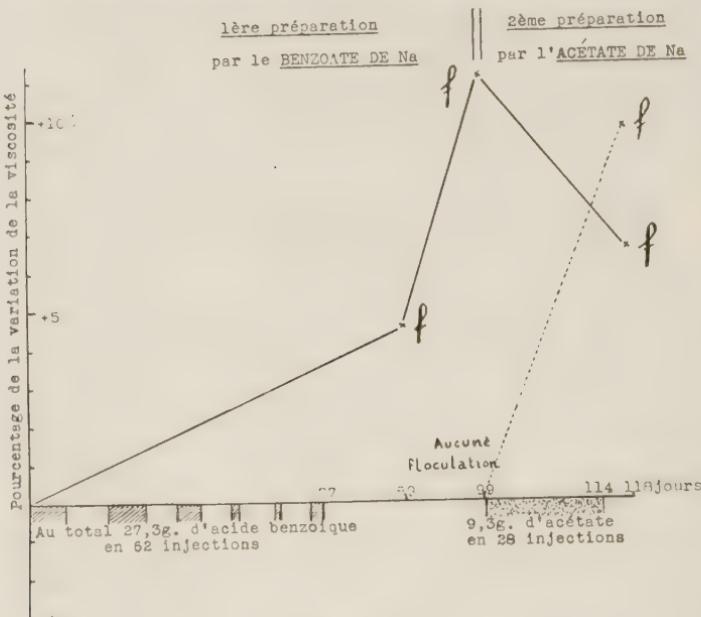


dans l'immense majorité des cas, quand ils sont soumis à une nouvelle immunisation de mauvais producteurs (7).

En résumé, cette possibilité de préparer indifféremment le même animal avec plusieurs antigènes simultanés ou successifs

(7) E. LEMÉTAYER, L. NICOL, O. GIRARD et R. CORVAZIER, *C. R. Soc. Biol.* 1946, **140**, 727.

PRÉPARATION D'UN LAPIN PAR DEUX ANTIGÈNES SUCCESSIFS



Courbe LIII.

PRÉPARATION PAR DEUX ANTIGÈNES « SUCCESSIFS ».

Courbe LII : Première préparation par 9 g. d'acétate de Na pendant quinze jours ; prise de sang quatre jours après. L'animal subit alors une deuxième préparation par 5,2 g. de phénol pendant quinze jours ; prise de sang, quatre jours après.

Courbe LIII : L'animal subit une première préparation prolongée pendant soixante-douze jours, avec 27,3 g. de benzoate de Na. Au quatre-vingt-dix-neuvième jour, alors que le taux de l'anticorps benzoïque est resté très élevé (avec pouvoir flocculant), l'animal subit une nouvelle préparation avec 9,3 g. d'acétate de Na administrés pendant quinze jours. Quatre jours après la fin de cette préparation, on constate la présence d'un anticorps-acétate et parallèlement une baisse importante de l'anticorps-benzoate. La γ -globuline flocule, à ce moment, avec l'acétate et encore légèrement avec le benzoate.

montre la souplesse extrême du mécanisme qui préside à la formation de l'anticorps.

(A suivre.)

DE L'AMYLOMALTASE D'*ESCHERICHIA COLI*

par JACQUES MONOD et ANNE-MARIE TORRIANI.

[Institut Pasteur, Service de physiologie microbienne (*).]

INTRODUCTION.

Au cours de nos recherches sur l'adaptation enzymatique nous avons été amenés à étudier les propriétés de l'enzyme responsable de l'attaque du maltose par la souche d'*Escherichia coli* que nous utilisions. On sait (Monod, 1947, 1948, 1949) que la formation adaptative de cet enzyme (pour lequel nous avons proposé le nom d'amylo-maltase) est soumise à un déterminisme génétique spécifique. Nous envisagerons ici ses propriétés biochimiques. Nos observations à ce sujet ont été partiellement résumées dans deux notes préliminaires (Monod et Torriani, 1948 ; Torriani et Monod, 1949), ou mentionnées dans d'autres publications (Monod, 1948).

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

SOUCHE. — La bactérie utilisée est la forme maltose-positive et lactose-positive (M+ L+) de la souche ML d'*E. coli* (Monod et Audureau, 1946, Monod, *loc. cit.*).

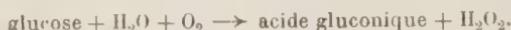
MILIEU ET CONDITIONS DE CULTURE. — Le milieu utilisé est le suivant :

PO ₄ KH ₂	27,2 g.
SO ₄ (NH ₄) ₂	4,0 g.
SO ₄ Mg 7H ₂ O.	0,4 g.
Cl ₂ Ca	0,01 g.
SO ₄ Fe.7H ₂ O.	0,0005 g.
NaOH	Q.S.P. pH 7,5
Eau distillée sur pyrex.	Q.S.P. 1 000 cm ³

Après stérilisation, ce milieu est additionné d'une solution concentrée de maltose (stérilisé par filtration) *q. s.* pour 0,8 p. 100. On répartit par lots de 250 cm³ dans des fioles coniques de 2 litres. Ces fioles sont ensemencées largement et agitées pendant quatorze heures environ à 34°.

(*) Ces recherches ont bénéficié d'une subvention du National Institute of Health., Bethesda, Md., U. S. A.

MESURES D'ACTIVITÉ. — Mise en présence de maltose, l'amylo-maltase libère du glucose et synthétise un polysaccharide. Il faut donc, pour suivre la réaction, disposer d'une technique qui permette de doser le glucose en présence de maltose. La méthode de Tauber et Kleiner n'ayant, entre nos mains, donné que des résultats fort peu satisfaisants, nous avons cherché à doser le glucose à l'aide d'un enzyme spécifique. La *glucose oxydase* de *Penicillium notatum* (notatine) s'est révélée être pour cela un précieux instrument de travail. On sait que cet enzyme catalyse la réaction :



Les préparations de notatine purifiée par la méthode de Coulthard et al. (1945) sont inactives en présence de la plupart des glucides (hexoses, pentoses, disaccharides, etc.) autres que le glucose (1). Elles permettent de doser manométriquement le glucose en présence de ces glucides avec une remarquable précision (3 p. 100 près pour des quantités de glucose de l'ordre de 1 mg.). Nous avons procédé à ce sujet à de nombreuses vérifications et dosages témoins. Cet emploi de la notatine ayant entre-temps été décrit en détail par Keilin et Hartree (1948), il n'est plus nécessaire d'en donner ici les justifications.

En pratique, on employait pour les mesures d'activité une solution tampon de phosphate M/10 pH 6,8 contenant 100 γ de notatine par centimètre cube, de l'azoture de sodium (M/50) et du maltose (M/30). Le compartiment principal des fioles de Warburg recevait 3 cm³ de cette solution, le diverticule 0,1 cm³ de solution d'enzyme, à dilution convenable. On faisait en sorte que la consommation d' O_2 ne fût pas inférieure à 50, ou supérieure à 300 mm³/h. environ. L'azoture de sodium a pour fonction d'inhiber la catalase qui pourrait contaminer les préparations. Pour certaines expériences, où l'on désirait éviter la formation d'eau oxygénée, la solution d'azoture était remplacée par une solution de ca'alase purifiée (2). Pour les expériences où il s'agissait d'établir le bilan de la réaction complète, on utilisait 5 à 10 μ M de maltose par fiole de Warburg. Enfin, pour les dosages de glucose après destruction de l'amylo-maltase, on introduisait 0,2 cm³ de notatine à 1 p. 1.000 dans le diverticule, et dans le compartiment principal 1 à 2 cm³ de la solution à titrer, amenée à pH 6,8 et additionnée d'azoture M/50.

(1) Nous avons employé des échantillons de notatine que nous avait obligamment fournis le Dr Short (Boots pure Drug Limited Co).

(2) Mise à notre disposition par M. Jean Rosenberg (Institut de Biologie physico-chimique, Paris).

SUCRES RÉDUCTEURS. — Nous avons employé la méthode de Somogyi (1945) avec le réactif chromogène de Nelson (1944).

RÉSULTATS.

EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'AMYLOMALTASE. — Après divers essais qu'il est inutile de rappeler ici, l'amylomaltase a pu être extraite et partiellement purifiée par la méthode suivante :

1^o Les bactéries sont récoltées à la centrifugeuse Sharples. On fait passer dans la centrifugeuse une quantité d'eau distillée équivalente à la quantité de milieu centrifugé (2 à 10 litres). La purée bactérienne est pesée et additionnée d'une solution tampon de phosphate M/20, pH 6,8, à raison de 200 cm³ environ pour 100 g. Du sable fin est ajouté à raison de 2 g. par centimètre cube de suspension. Le mélange est agité dans un appareil à secousses très rapides pendant quarante minutes.

2^o La masse crémeuse est centrifugée à 12.000 tours pendant quinze minutes. Le liquide surnageant est décanté. Le culot est repris dans 100 cm³ de tampon et centrifugé à nouveau. Cette opération est répétée une seconde fois. Les liquides surnageants sont mélangés.

3^o La préparation est additionnée de maltose, *q. s.* pour M/20. On précipite par le sulfate d'ammoniaque solide, *q. s.* pour 75 p. 100 de saturation (à froid). Après deux heures, le précipité est séparé par centrifugation et redissous dans 100 cm³ de tampon. On précipite trois fois de suite dans les mêmes conditions avec du sulfate d'ammoniaque solide, *q. s.* pour 50 p. 100 de saturation. Le dernier précipité est repris dans environ 20 cm³ de tampon. L'insoluble est éliminé par centrifugation (toutes les opérations se font à 0°).

4^o Cette solution est dialysée à froid contre de l'eau distillée courante avec agitation. Un précipité doit se former (3).

5^o Le précipité, après centrifugation, est repris par 5 cm³ de solution tampon de véronal M/40 additionnée de sulfate de soude M/5 ; pH 6,8. Après une nuit à 0°, l'insoluble est centrifugé.

Dans beaucoup d'expériences nous avons employé la préparation obtenue au stade 3. Ces préparations contiennent souvent des quantités non négligeables d'amylase et sans doute de phosphorylase. Pour étudier la réaction en l'absence de PO₄ et la réaction réverse (p. 72) nous avons employé exclusivement les

(3) La précipitation par dialyse ne donne pas de résultats satisfaisants avec tous les lots. Si la précipitation est nulle ou insuffisante, on acidifie le dialysat avec ménagement par l'acide acétique jusqu'à pH 5,2. Le précipité obtenu est traité comme en 5.

préparations obtenues au stade 5. Les meilleures préparations métabolisaient environ 5.000 μ M de maltose par heure et par centimètre cube de solution.

RÉACTION DE L'AMYLOMALTASE EN PRÉSENCE DE NOTATINE ET DE MALTOSE. — En présence de maltose à forte concentration (M/30) et de notatine, l'amyloomaltase libère du glucose à un taux cons-

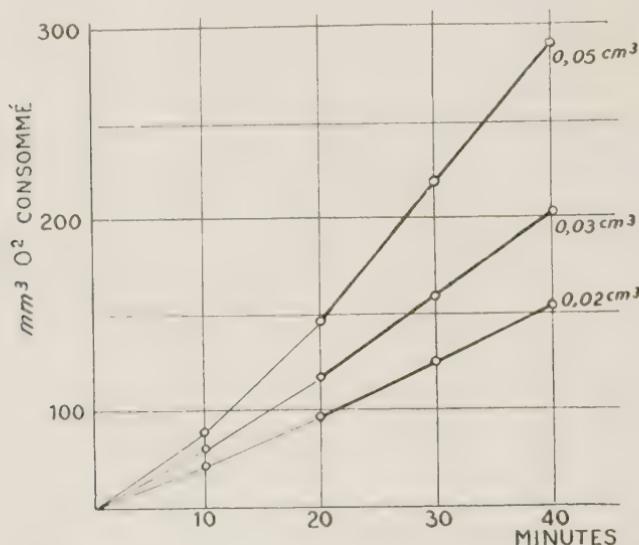


FIG. 4. — Consommation d'oxygène observée dans l'appareil de Warburg avec différentes quantités d'amyloomaltase, en présence de maltose M/30, notatine et azoture de sodium. Les chiffres en regard de chaque courbe donnent le nombre de centimètres cubes de la solution d'amyloomaltase introduits dans le diverticule. Après une période initiale pendant laquelle la consommation d' O_2 s'accroît, on obtient un taux constant (traits gras) sensiblement proportionnel à la quantité d'amyloomaltase employée.

tant et proportionnel à la concentration de l'enzyme (fig. 1) ; l'intensité de la réaction est maximum à pH 6,8 environ.

Avec des quantités limitées de maltose (5 à 15 μ M par fiole de Warburg) on constate que la courbe de la réaction est hyperbolique et tend vers une asymptote correspondant à la libération d'une molécule de glucose par molécule de maltose mis en jeu (fig. 2), soit donc à la moitié du glucose contenu dans le maltose. Un dosage par la méthode de Somogyi effectué en fin de réaction avec le liquide des fioles révèle que les sucres réducteurs ont effectivement disparu.

Si l'on ajoute quelques gouttes d'une solution d'iode au liquide

des fioles de Warburg à différents stades de la réaction, on obtient une teinte orangée à partir de 60 p. 100 environ, rouge vers 80 p. 100, violette enfin ou bleue (suivant les préparations employées) lorsqu'on approche de l'asymptote. Un polysaccharide du type de l'amidon est donc synthétisé.

Le glucose correspondant au polysaccharide formé peut être dosé par la notatine après hydrolyse du liquide pendant quatre

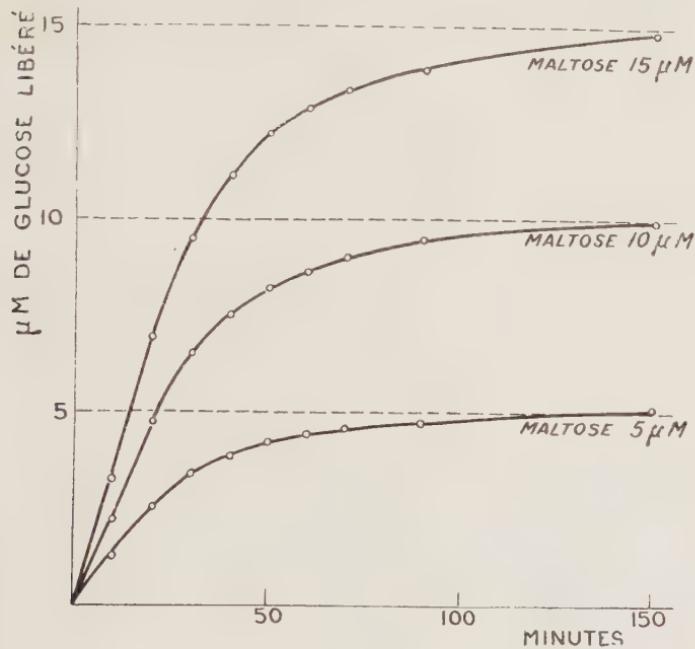
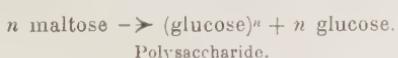


FIG. 2. — Libération du glucose par l'amylomaltase en présence de notatine à partir de différentes quantités initiales de maltose. Expérience faite dans l'appareil de Warburg à 28°. Les fioles contenaient respectivement 5, 10 et 15 μM de maltose.

heures par l'acide sulfurique 2 N à 100°. On obtient ainsi le bilan complet de la réaction (tableau I). Ce bilan correspond presque rigoureusement à la réaction suivante :



Le polysaccharide formé a pu être partiellement purifié par précipitation à l'iode et fractionnement à l'alcool. Nous avons obtenu ainsi 200 mg. environ d'un produit blanc, soluble dans l'eau chaude, donnant avec l'iode une intense coloration bleue et

TABLEAU I. — Bilan de la réaction de l'amylomaltase en présence de notatine.

Mélange effectué en tampon phosphate M/10, pH 6,8 :	
Maltose	200 μ M
Notatine	1,6 mg
Solution de catalase	0,01 cm ³
Solution d'amylomaltase	2 cm ³
Volume total 16,5 cm ³ , réparti entre plusieurs fioles de Warburg.	
Température : 28°. — Durée de la réaction : 190 minutes.	
	μ M
Glucose oxydé par la notatine au cours de la réaction	197
Sucre réducteur (maltose) en fin de réaction	0
Glucose du polysaccharide, dosé par la notatine après hydrolyse de 4 heures à 100° par $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$	196
Total	393
	(total théorique 400)

libérant, par hydrolyse acide prolongée à 100°, une quantité de glucose équivalente à 80 p. 100 de son poids.

Il faut noter ici qu'avec certaines préparations, la consommation d'oxygène théorique est parfois dépassée, encore qu'avec une extrême lenteur. Le polysaccharide formé en présence de ces préparations donne une teinte violette et non bleue. Ces résultats doivent sans doute être attribués à la présence d'une amylase ou d'une phosphorylase contaminant les préparations. Avec les préparations dialysées (stade 5) l'asymptote théorique n'est pas sensiblement dépassée.

RÔLE DU PHOSPHATE DANS LA RÉACTION. — Comme la synthèse *in vitro* d'un amidon n'avait été observée, jusqu'ici, qu'en présence de phosphorylase, il paraissait vraisemblable que la réaction de l'amylomaltase impliquât une phosphorylation avec formation de glucose-1-phosphate. Cette hypothèse semble devoir être écartée pour les raisons suivantes :

1^o La réaction ne s'accompagne d'aucune estérification de phosphate, autant qu'on puisse en juger par le dosage du phosphate minéral (par la méthode de Fiske et Subbarow) ;

2^o La recherche du glucose-1-phosphate est restée infructueuse, malgré de nombreux essais ;

3^o Le glucose-1-phosphate, mis en présence d'une préparation d'amylomaltase est lentement hydrolysé, mais il ne se forme pas de traces décelables de polysaccharide, même si une petite quantité de maltose est ajoutée pour amorcer la réaction ;

4° Avec les préparations dialysées, ne contenant plus de phosphate minéral en quantité décelable, on constate que la réaction se produit aussi bien, que l'on ajoute ou non du phosphate (fig. 3).

RÉACTION DE L'AMYLOMALTASE EN L'ABSENCE DE NOTATINE. — Comme on vient de le voir, en présence de notatine la réaction catalysée par l'amylo-maltase est complète : le maltose disponible est quantitativement transformé en polysaccharide et glucose.

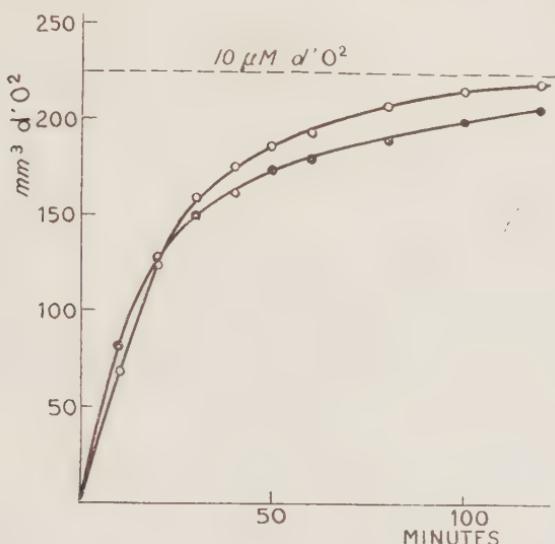


FIG. 3. — Réaction de l'amylo-maltase en présence et en absence d'ion PO_4 . Les fioles de Warburg contenaient $10 \mu\text{M}$ de maltose et de l'azoture de sodium M/50.

- 1) points blancs : solution tampon de phosphate M/20, pH 6,8;
- 2) points noirs : solution tampon de citrate de soude M/20, pH 6,8.

Ceci dans des conditions où l'un des produits de la réaction, le glucose, est constamment éliminé.

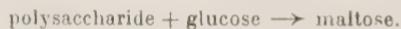
En l'absence de notatine, c'est-à-dire lorsque le glucose s'accumule, le cours de la réaction est bien différent. Elle tend à s'arrêter lorsque le glucose libéré atteint 60 p. 100 environ de la valeur théorique. La réaction à l'iode reste négative (on décelle cependant parfois une légère teinte rose). Le pouvoir réducteur (déterminé après oxydation du glucose libre) diminue, mais sa valeur, au moment de la stabilisation, reste plus élevée que ne le ferait prévoir l'équation théorique si l'on supposait le polysaccharide formé dénué de pouvoir réducteur (tableau II). Ces obser-

TABLEAU II. — Réaction de l'amylomaltase
en l'absence de notatine

Solution tampon phosphate M/10 pH 6,8	8,25 cm ³	
Maltose M/10	1,00 (= 100 µM)	
Préparation d'amylomaltase	0,75 cm ³	
Température : 28° C.		
<i>Dosage du glucose par la notatine.</i>		
<i>Sucre réducteurs dosés par la méthode de Somogyi après élimination du glucose par la notatine.</i>		
TEMPS	GLUCOSE LIBÉRÉ EN µM pour 10 cm ³	SUCRES RÉDUCTEURS exprimés en µM de maltose pour 10 cm ³
5 minutes	20	96
1 heure	46	72
3 heures	56	68
4 heures	56	52

vations montrent donc que la réaction tend vers un niveau d'équilibre lorsque le rapport des concentrations moléculaires maltose, glucose atteint la valeur 0,75 environ. Elles suggèrent en outre qu'en présence de glucose il se forme seulement de courtes chaînes de dextrines réductrices.

RÉVERSIBILITÉ. — Quoi qu'il en soit, ces résultats indiquent, et c'est là leur principal intérêt, que la réaction de l'amylomaltase, comme celle des phosphorylases, est réversible. Reste à vérifier que la réaction peut effectivement se produire dans le sens :



Cette équation implique que le polysaccharide ne soit pas attaqué par l'enzyme en l'absence de glucose. En présence de glucose, au contraire, du maltose doit apparaître, aux dépens de celui-ci et du polysaccharide. Cette expérience n'a pu être réalisée qu'avec les préparations dialysées (stade 5), qui sont suffisamment débarrassées de phosphorylase et d'amylase. La réaction à l'iode permet de démontrer très simplement qu'en l'absence de glucose, le polysaccharide n'est pas dégradé, alors que l'addition de glucose provoque une baisse rapide de la teinte (fig. 4).

L'expérience résumée par le tableau III montre que le glucose disparaît au cours de cette réaction, alors que le pouvoir réducteur augmente. En l'absence de glucose, le pouvoir réducteur ne s'accroît pas, et en l'absence de polysaccharide, le glucose ne disparaît pas. Enfin, on voit que la réaction tend sensiblement vers

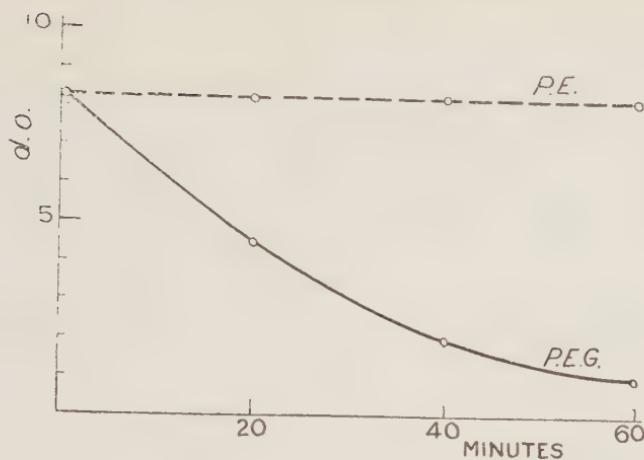


FIG. 4. — Dégradation du polysaccharide par l'amylo-maltase en présence et en absence de glucose. Mélanges effectués en tampon phosphate M/20, pH 6,8 : P, polysaccharide M/100 (molarité exprimée en équivalents glucose); G, glucose M/100; E, préparation d'amylo-maltase diluée au 1/20. L'ordonnée exprime (en unités arbitraires) la densité optique d'échantillons additionnés d'une quantité donnée d'une solution d'iode. La densité optique correspondant à l'iode seule a été déduite. Température : 28° C.

TABLEAU III. — Réaction de l'amylo-maltase en présence de polysaccharide et de glucose.

Mélanges effectués en tampon phosphate M/10, pH 6,8 :

P : Polysaccharide (exprimé en glucose) 10 μ M/cm³
 G : Glucose 10 μ M/cm³
 E : Préparation d'amylo-maltase (stade 5) diluée au 1/20.
 Température : 28°.

Glucose titré par la notatine.

Sucre réducteur titré après élimination du glucose

	GLUCOSE DISPARU en μ M par cm ³				POUVOIR RÉDUCTEUR en μ M de maltose par centimètre cube			
	0'	15'	30'	60'	0'	15'	30'	60'
P. G. E	0	1,2	2,7	3,8	4,1	3,1	4,0	3,0
P. E				6	1,3	1,5		
G. E	0							4,4

le même niveau d'équilibre que lorsqu'elle se produit dans l'autre direction.

Ces expériences ont été faites en utilisant une solution du polysaccharide formé par l'enzyme (en présence de notatine). Il eut été intéressant d'éprouver l'activité de l'amylomaltase en présence d'amidons ou de glycogènes d'origines diverses. Quelques essais ont montré que l'enzyme était actif avec l'amidon de pomme de terre, mais que la réaction était alors beaucoup plus lente.

SPÉCIFICITÉ. — Les préparations d'amylomaltase se sont montrées dépourvues d'activité mesurable en présence des glucides suivants :

Saccharose,
Lactose,
Mélibiose,
Cellbiose,
 α -méthyl-*d*-glucoside.

En revanche, toutes les préparations présentaient une activité assez marquée avec le tréhalose. Encore que le tréhalose soit, comme le maltose, un α -*d*-glucoside, il ne semble pas que cette activité soit due à l'amylomaltase elle-même. Il s'agit sans doute d'une tréhalase qui contamine les préparations. En effet : 1° il ne se forme pas de polysaccharide aux dépens du tréhalose ; 2° les extraits bruts de bactéries cultivées en glucose (c'est-à-dire non adaptées au maltose) sont pratiquement exempts d'amylomaltase, mais présentent une activité notable envers le tréhalose ; 3° cette activité persiste, mais n'est pas sensiblement plus forte avec les extraits de bactéries cultivées en maltose, extraits qui contiennent une amylomaltase très active.

Il semble donc que l'amylomaltase soit spécifique de la molécule de maltose et n'attaque pas les autres α -glucosides.

DISCUSSION.

LES TRANSGLUCOSIDASES. --- A la suite de la découverte des phosphorylases et des études approfondies auxquelles elles ont donné lieu, l'opinion semble avoir prévalu que les polysaccharides du type amidon ou glycogène sont des produits caractéristiques de ces enzymes. Ainsi Cori pouvait-il écrire, en 1945 : « A sufficient number of cases has been tested to expect that wherever polysaccharides belonging to the starch and glycogen type are found, glucose-1-phosphate will be the substrate from which they are formed. »

L'isolement et l'étude de l'amylomaltase apportent la preuve qu'un polysaccharide réagissant avec l'iode peut se former à

partir d'un disaccharide, sans formation intermédiaire de glucose-1-phosphate et en l'absence de phosphate minéral. Le fait est d'autant plus significatif que la réaction de l'amylomaltase, réversible comme celle des phosphorylases, est identique à cette dernière, à ceci près que le substrat en est un glucoside-glucose, au lieu d'un glucoside-phosphate.

Ces observations ont d'ailleurs rapidement trouvé confirmation et extension grâce aux recherches de Hehre (1949) et de Doudoroff et ses collaborateurs (1949). Ces derniers ont étudié le métabolisme du maltose par des suspensions d'un mutant d'*E. coli* (souche K 12), incapable d'utiliser le glucose. Ils ont montré que ce métabolisme impliquait l'intervention de l'amylomaltase qui, en présence de glucose, synthétisait des dextrines à chaînes courtes (4 à 6 unités). L'addition de phosphate minéral ne modifiait pas l'activité de l'enzyme, dont ils ont pu démontrer la réversibilité d'action. Hehre et Hamilton (1946, 1948) après avoir observé la formation d'amidon à partir de saccharose ou de glucose-1-phosphate en présence de suspensions et d'extraits de *Neisseria perflava*, ont montré (1949), grâce à des expériences d'inhibition différentielle, que deux enzymes distincts étaient, selon toute vraisemblance, en cause : une phosphorylase, active sur le glucose-1-phosphate, et une « amylosucrase » dont l'activité serait indépendante de la présence de phosphate minéral, et n'impliquerait pas la formation intermédiaire de glucose-1-phosphate.

En ce qui concerne, maintenant, la synthèse de polyhexosides autres que l'amidon ou le glycogène, on sait que des préparations d'origine bactérienne, étudiées en particulier par Hestrin et ses collaborateurs (1943), par Hehre (1946) et par Stacey (1942) catalysent la formation de dextranes ou de lévanes à partir du saccharose, par une réaction formellement identique à celle de la phosphorylase ou de l'amylomaltase. Il est vrai que la réversibilité de ces réactions n'a pu être démontrée avec certitude (Doudoroff et O'Neal, 1945), mais comme le suggèrent Doudoroff et al. (1949) ceci pourrait tenir à ce que l'énergie de la liaison glucosidique serait plus élevée dans le saccharose que dans le maltose ou dans les polysaccharides.

Enfin, rappelons que, grâce aux belles recherches de Doudoroff et ses collaborateurs (1947 a, b, c) sur la « sucrose-phosphorylase » de *Pseudomonas saccharophila*, on connaît un enzyme capable de transférer réversiblement la liaison glucosidique d'un disaccharide au glucose-1-phosphate comme à d'autres glucosides. Doudoroff, Hassid et Barker avaient alors proposé de considérer les phosphorylases, la sucrose-phosphorylase, et les lévanes et dextrane-sucrases comme des « transglucosidases ». L'amylomaltase est une transglucosidase typique. Comme les phosphorylases,

elle synthétise un amidon, mais son substrat est un disaccharide, ce qui la rapproche également des dextrane- et lévane-sucrases. Ceci met bien en évidence l'analogie profonde de ces différentes réactions, et paraît devoir lever les objections que l'on pouvait trouver à rapprocher ces derniers enzymes des phosphorylases.

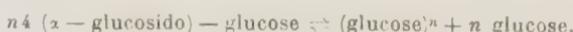
Il ne s'agit pas là seulement d'une question de nomenclature. Il est naturel de supposer que l'analogie étroite des réactions catalysées par les transglucosidases implique une identité de mécanisme. Aussi serait-il du plus grand intérêt d'arriver à isoler à l'état de pureté un enzyme tel que l'amylomaltase pour vérifier l'hypothèse, qui se propose d'elle-même, que son activité est liée à la présence d'un groupement prosthétique phosphoryle.

Quoi qu'il en soit, d'intéressants problèmes se posent à propos de la réaction de l'amylomaltase. On sait que la synthèse de l'amidon par la phosphorylase doit être amorcée par une trace de polysaccharide. Il se peut qu'il en soit de même pour l'amylomaltase, mais il est concevable que le maltose lui-même puisse servir d'amorce. Le fait que la teinte obtenue avec l'iode ne devienne intense qu'en fin de réaction, quelle que soit la concentration de maltose employée, s'explique très naturellement dans cette hypothèse. C'est d'ailleurs ce que suggèrent aussi certaines observations de Doudoroff (1949). Une étude approfondie des conditions d'équilibre de la réaction, et de l'influence du glucose sur la longueur et la structure des chaînes formées, devrait également conduire à des résultats significatifs.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° L'amylomaltase d'*E. coli* a pu être extraite et partiellement purifiée par fractionnement au sulfate d'ammoniaque et dialyse.

2° Cet enzyme catalyse la réaction :



3° Lorsque le glucose formé est éliminé la réaction est complète. Le polysaccharide formé donne une réaction bleue avec l'iode.

4° Lorsque le glucose n'est pas éliminé, la réaction est incomplète : elle atteint 60 p. 100 environ à 28° et pH 6.8. Le polysaccharide formé ne donne pas de réaction à l'iode.

5° Cette réaction est réversible ; elle atteint sensiblement le même niveau d'équilibre, qu'elle se produise dans l'une ou dans l'autre direction.

6° L'amylomaltase paraît être spécifique du maltose.

BIBLIOGRAPHIE

CORI (C. F.). *Feder. Proceed.*, 1945, **4**, 226.

COULTHARD (C. E.), MICHAELIS (R.) et coll. *Biochem. J.*, 1945, **39**, 24.

DOUDOROFF (M.) et O'NEAL (R.). *J. biol. Chem.*, 1945, **159**, 585.

DOUDOROFF (M.), BARKER (H. A.) et HASSID (W. Z.). *J. biol. Chem.*, 1947 *a*, **168**, 725 ; *ibid.*, 1947 *b*, **168**, 733 ; *ibid.*, 1947 *c*, **170**, 147.

DOUDOROFF (M.), HASSID (W. Z.) et coll. *J. biol. Chem.*, 1949, **179**, 921.

HEHRE (E. J.). *J. biol. Chem.*, 1946, **163**, 221 ; *ibid.*, 1949, **177**, 267.

HEHRE (E. J.), CARLSON (A. S.) et NEILL (J. M.). *Science*, 1947, **106**, 523.

HEHRE (E. J.) et HAMILTON (D. M.). *J. biol. Chem.*, 1946, **166**, 777 ; *J. Bact.*, 1948, **55**, 197.

HESTRIN (S.) et coll. *Biochem. J.*, 1943, **37**, 450.

KEILIN (D.) et HARTREE (E. F.). *Biochem. J.*, 1948, **42**, 230.

MONOD (J.). *Growth XI*, 1947, **4**, 223.

MONOD (J.). In *Unités biologiques douées de continuité génétique*, édit. C. N. R. S., Paris, 1948, 181.

MONOD (J.). *Symp. Biochem. Society*, 1949 (sous presse).

MONOD (J.) et AUDUREAU (A.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 868.

MONOD (J.) et TORRIANI (A. M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **227**, 240.

NELSON (N.). *J. biol. Chem.*, 1944, **153**, 375.

SOMOGYI (M.). *J. biol. Chem.*, 1945, **160**, 61.

STACEY (M.). *Nature*, 1942, **149**, 639.

TORRIANI (A. M.) et MONOD (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 718.

LA SURVIE DU BACILLE TYPHIQUE VI ET DE SON BACTÉRIOPHAGE DANS L'EAU

par A. GUELIN.

(Institut Pasteur, Service du Bactériophage
et Laboratoire d'Hydrobiologie du C. N. R. S. à Gif-sur-Yvette.)

La persistance du bacille typhique et de son bactériophage dans l'eau non stérile a été étudiée dans des bassins disposés en plein air et, par conséquent, dans des conditions se rapprochant des conditions naturelles.

Les résultats obtenus montrent la disparition assez rapide du bacille d'Eberth, surtout dans la couche d'eau superficielle. Le bactériophage, au contraire, persiste plus longtemps et peut être décelé en quantité considérable, même au cours du deuxième mois. En rapprochant ces recherches de nos travaux précédents, on peut admettre que l'absence du bactériophage typhique Vi dans les eaux exclut la contamination par le bacille d'Eberth. Sa détection permettrait au contraire d'affirmer que cette eau a été polluée par le bacille typhique. Toutefois, ces données ne sont pas suffisantes pour déterminer la contamination actuelle ou passée. De nouvelles recherches seront nécessaires pour élucider ce point.

DISCUSSION ET TECHNIQUE.

Le bactériophage, comme l'a dit d'Hérelle, est un satellite des bactéries ; il est décelable au millionième. De ce fait, sa recherche et son titrage permettent de définir le degré de pollution bactérienne des eaux. D'autre part, d'après les résultats de nos expériences précédentes, il ressort qu'au moyen de souches sensibles appropriées, on peut déceler la présence de germes pathogènes dans les eaux.

Il y a encore peu de temps, en raison de la polyvalence de nombreux phages, il semblait impossible d'utiliser les méthodes d'isolement et d'enrichissement des bactériophages des eaux pour affirmer la présence du bacille typhique dans celles-ci. Schuurman et Schuurman ten Bokel, en étudiant les phages typhiques dans les eaux de Tji-Liwung, ont été catégoriques sur ce point. Mais les connaissances actuelles sur l'antigène Vi de Felix et la découverte, en 1936, de bactériophages appropriés (Craigie et Brandon,

Scholtens, Sertic et Boulgakov) nous ont permis de poser à nouveau ce problème.

Nous avons montré déjà la présence, dans les eaux polluées, des phages étroitement spécifiques et exclusivement actifs sur certaines souches Vi du bacille typhique. Ces résultats ne peuvent pas encore être utilisés en pratique. Au préalable, il faudra entreprendre des recherches complémentaires dans les directions suivantes : 1^o sélectionner des souches standard du bacille typhique, et 2^o étudier le comportement du bacille typhique et de son bactériophage dans les milieux naturels, hors du laboratoire.

La sélection des souches est une condition très importante. La présence dans une eau d'un phage actif sur le bacille typhique ne signifie pas que ce phage provient nécessairement de ce bacille. Il existe des phages polyvalents, actifs sur des représentants des espèces *coli*, typhique, dysentérique. Avec de tels phages, on ne peut exclure complètement l'éventualité d'une multiplication aux dénens du *B. coli* par exemple. Pour être certain de l'origine typhique du bactériophage isolé, il est indispensable de choisir des souches exclusivement sensibles aux bactériophages Vi. Leur choix ne présente aucune difficulté, comme nous l'avons déjà signalé au sujet du bacille typhique Vi 4 (1). Parmi ces souches, il faudrait prendre les représentants les plus caractéristiques et les plus répandus du bacille d'Eberth.

Les bactériophages isolés au moyen de ces diverses souches pourraient recevoir en toute sécurité l'étiquette phages-typhiques Vi. Leur présence permet d'affirmer que les eaux en question ont été à un moment donné en contact avec un foyer de contamination. Mais la persistance du bactériophage dans l'eau est-elle égale ou supérieure à celle du bacille typhique ? Le phage présent dans l'eau n'est peut-être qu'un témoin attardé du passage d'un bacille disparu depuis longtemps. D'où la nécessité d'une étude comparative de persistance du bactériophage et du bacille typhique.

Dans notre précédent travail, étudiant l'influence de certains facteurs physiques sur la résistance du bactériophage Vi dans l'eau, nous avons conclu à la nécessité de poursuivre les recherches hors du laboratoire. Il est évident que le comportement d'un bactériophage, étudié dans une petite quantité de liquide dans les conditions du laboratoire, se distingue de son comportement au sein d'une rivière ou d'un étang par exemple. Dans ces conditions, l'action des facteurs physiques et biologiques diffère totalement. Il était donc indispensable d'expé-

(1) C'est par erreur que la souche du bacille typhique Vi 4 a été indiquée comme provenant de la collection de l'Institut Pasteur. Elle nous a été apportée en vue d'une étude détaillée par M. Eugène Wollman, en 1942.

rimenter sur une grande quantité d'eau non stérile, en plein air et à la lumière.

Le Laboratoire d'Hydrobiologie du Centre National de la Recherche Scientifique, sous la direction de M. Pacaud, nous a permis de réaliser, en partie, de telles expériences.

Dans un terrain découvert du parc de Gif-sur-Yvette, des bassins bétonnés ont été construits et aménagés dans le sol ; la contenance de chacun est de 230 litres. Un robinet placé à la partie supérieure de chaque bassin permet facilement leur remplissage avec de l'eau provenant d'un étang voisin. Un robinet de vidange, placé au fond du bassin, rend possible l'écoulement des eaux. Une simple grille recouvre la surface de l'eau qui se trouve exposée à la lumière du jour et aux températures extérieures. Le niveau de l'eau est mesuré par un petit appareil construit sur les indications de V. Frolow. Aussi, les titrages restent-ils exacts malgré les variations de volume d'eau, consécutifs à l'évaporation, ou, au contraire, aux chutes de pluie.

L'eau des bassins qui sert pour les expériences provient, comme nous l'avons indiqué, de l'étang voisin, et n'est pas stérilisée. Les germes et les phages très spécifiques que nous employons ne se rencontrent que dans les eaux très polluées. Il était d'avance certain que l'eau de l'étang se trouvant dans un parc fermé et loin de toute habitation humaine ne devait contenir ni ces bactéries, ni ces phages. Des recherches préalables nous ont, au surplus, apporté la preuve de leur absence.

Ces premiers essais dans les conditions décrites ne visent qu'à des notions générales sur le sort subi par un germe pathogène et par son satellite, le bactériophage, une fois placés dans les conditions décrites. Ils serviront en même temps d'épreuve pour le procédé employé par nous dans l'étude bactériologique des eaux, hors du laboratoire.

1^o COMPORTEMENT DU BACTÉRIOPHAGE TYPHIQUE VI DANS L'EAU.

Après vérification de l'absence du bactériophage dans l'eau d'un bassin, on introduit dans celui-ci le bactériophage Vi II (de Rh. Scholtens). Titrages hebdomadaires des prélèvements.

Les résultats montrent que, durant trois semaines, la quantité de bactériophage reste stable : 1.10^6 corpuseules par litre en moyenne. Ensuite, son titre baisse de dix fois environ, la diminution s'accentue et, à partir du troisième mois, il n'y a plus qu'une quantité très faible : 200 à 100 corpuseules par litre.

Durant les quatre mois d'étude, nous avons pu constater que la quantité de bactériophage est à peu près identique aux différents points de la surface du bassin. Les prélèvements faits à partir du deuxième mois à des profondeurs diverses (30, 50 et 70 cm.) ont montré que le titre du bactériophage augmente à

mesure que l'eau est prélevée plus loin de la surface. Les différences des titres bactériophagiques, au fond et à la surface, sont assez importantes, comme l'indiquent les chiffres suivants : 1.10^5 corpuscules par litre à la surface du bassin ; 1.10^6 à 30 cm., 1.10^8 à 50 cm. et 1.10^9 à 70 cm. en profondeur.

Ainsi, on peut donc admettre que le bactériophage typhique déposé à la surface des eaux stagnantes peut être décelé en quantités considérables durant des semaines. Il se concentre vers le fond où son titre est plus élevé qu'à la surface.

CONSERVATION DU BACILLE TYPHIQUE DANS L'EAU.

L'infection des bassins situés en plein air par un germe pathogène n'était pas indiquée. C'est pourquoi nous avons expérimenté avec des ballons de 5 litres emplis d'eau du bassin non stérilisée, et qui y sont plongés soit à 10, soit à 50 cm. de profondeur. Ces ballons ne sont emplis qu'au deux tiers et bouchés chacun par un bouchon de caoutchouc.

L'eau des ballons est préalablement étudiée au point de vue bactériologique. Par étalement sur plaques de gélose, on n'observe qu'une quantité limitée de colonies dont l'aspect ne peut être confondu avec celui du bacille typhique. Ensuite, une quantité considérable de germes est introduite dans les ballons, de manière à pouvoir diluer les prélèvements avant de les titrer. Au cours des titrages, chaque colonie douteuse est soumise par précaution à l'action du bactériophage Vi H.

La persistance du bacille typhique dans l'eau n'est pas de longue durée. On peut constater une disparition plus rapide des bactéries à la surface du bassin qu'en profondeur. Les résultats des titrages ci-dessous indiquent la survie du bacille typhique :
Surface : 15 heures, 40 p. 100; 24 heures, 15 p. 100; 2 jours, 0,7 p. 100; 3 jours, 0.
Profondeur (à 50 cm. de la surface) : 15 heures, 64 p. 100; 24 heures, 42 p. 100; 2 jours, 7 p. 100; 3 jours, 1 p. 100; 4 jours, 0,3 p. 100.

Si on compare la survie du bacille typhique d'une part dans l'eau autoclavée, d'autre part dans l'eau non stérile, durant les expériences faites à 50 cm. de profondeur, on constate qu'au bout de quatre jours, le bacille est encore décelable (jusqu'à 10 p. 100 de son titre initial) dans l'eau stérilisée ; tandis que dans l'eau non autoclavée, il a pratiquement disparu (0,3 p. 100).

Nous voudrions exprimer ici nos vifs remerciements à M^{me} Le Bris, qui a largement participé à ces recherches.

RÉSUMÉ.

Les recherches sur la conservation du bacille typhique Vi et de son bactériophage dans les eaux non stérilisées ont été effec-

tuées hors du laboratoire dans des bassins exposés à l'action de l'air et de la lumière.

Dans ces conditions, la persistance du bacille typhique Vi 4 dans l'eau n'est pas de longue durée. Le troisième jour, les bactéries ont disparu déjà à la surface de l'eau du bassin, mais à 50 cm. de profondeur, elles sont décelables encore au cinquième jour. La persistance du bacille typhique dans l'eau autoclavée est nettement supérieure à celle que l'on observe dans des eaux non autoclavées.

Le bactériophage typhique Vi II persiste en quantité considérable pendant plusieurs semaines en se concentrant en profondeur. La présence du bactériophage Vi dans l'eau, indiquant sa contamination possible par le bacille d'Eberth, ne détermine donc pas l'actualité de la contamination.

ÉTUDE DE QUELQUES SUBSTANCES,
DÉRIVEES DE TERPÈNES,
CAPABLES D'ACCROITRE LA SENSIBILITÉ
DES RÉVÉLATEURS DE RÉAGINES SYPHILITIQUES
(LE CAMPHÈNE, L'ISOBORNÉOL, LE THYMOL,
LE MENTHOL)

par L. SAINT-PRIX et S. MUTERMILCH.

(*Hôpital Henri-Rousselle.*)

L'instabilité des suspensions colloïdales obtenues par l'action de l'eau distillée ou salée sur la teinture de camphre et leur aspect rappelant celui des émulsions au benjoin et au baume de tolu, nous ont incités à essayer leur comportement vis-à-vis des réagines syphilitiques ; des expériences, conduites à cet effet, ont démontré (1) l'action stimulante d'une teinture camphrée à l'égard du tolu-antigène dans la réaction d'opacification de Meinicke. La réaction obtenue s'est révélée d'une sensibilité bien supérieure à celle de toutes les autres réactions sérologiques couramment employées ; l'étude plus approfondie de la question a montré que des échantillons divers de camphre comparés entre eux au point de vue sérologique étaient doués d'une activité irrégulière et nous avons alors émis l'hypothèse que le rôle sensibilisateur du camphre était dû, non au camphre lui-même, mais à des « impuretés » entrant dans la composition des camphres « actifs ».

La fabrication du camphre synthétique se fait, en effet, à partir de l'essence de térébenthine dont la base est le *pinène* et le *nopinène* ; ces deux corps, sous l'action du gaz chlorhydrique sec, se transforment en chlorure de bornyle, lequel, traité par la soude, la potasse, le phénate de sodium, etc., donne le *camphène*. Ce dernier, chauffé avec un acide organique, se transforme en esters correspondants de l'isobornéol, desquels, après saponification, l'on obtient, par oxydation, le *camphre*. Ces étapes suc-

(1) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juillet 1949.

cessives de la synthèse du camphre peuvent être représentées par le schéma suivant :

Pinène \rightarrow Chlorure de bornyle \rightarrow Ester organique de bornéol \rightarrow
Bornéol et Isobornéol \rightarrow Camphre.

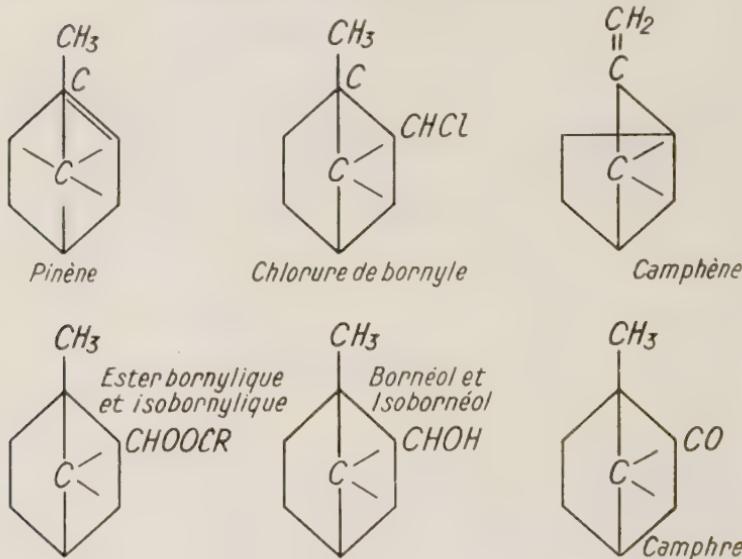


FIG. 1.

Notre étude a porté sur le camphène et l'isobornéol.

I. — RÉACTION AU CAMPHÈNE.

Le camphène, hydrocarbure de formule

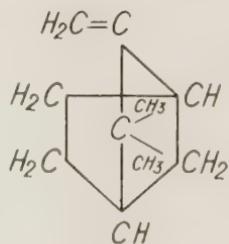


FIG. 2.

a été employé en solution à 1 p. 100 dans l'alcool à 90°.

L'antigène au camphène est un mélange d'extrait alcoolique de cœur de cheval, de teinture de baume de tolu et de teinture de camphène ; la combinaison qui nous a donné les résultats les plus satisfaisants correspond à la formule suivante :

Extrait alcoolique de cœur, épuisé par l'acétone, au 1/1	
dans l'alcool à 95°	0,5 cm ³
Teinture-mère de tolu diluée au 1/12 dans l'alcool à 95° . . .	0,5 cm ³
Teinture de camphène.	0,1 cm ³

La technique de la séro-réaction est ensuite similaire à celle de la réaction d'opacification de Meinicke :

Deux tubes, par réaction, reçoivent chacun 0,2 cm³ de sérum frais ; le tube témoin reçoit, en outre, 1 goutte de formol du commerce ; on introduit alors dans les deux tubes 1 cm³ de la suspension obtenue par le mélange rapide de 1 cm³ d'antigène camphéné et de 10 cm³ d'eau salée à 3 p. 100, après leur chauffage préalable, pendant dix minutes, au bain-marie à 48°. On agite et on laisse les tubes à la température du laboratoire pendant vingt-quatre heures.

Les sérum très positifs floquent en clarifiant le mélange avec la formation d'un dépôt volumineux ;

Les sérum positifs floquent sans clarifier complètement le mélange ;

Les sérum faiblement positifs opacifient le mélange d'une façon plus ou moins intense ;

Les sérum négatifs ne floquent pas et conservent au mélange sa transparence initiale.

419 sérum ont été examinés au moyen de cette nouvelle réaction comparativement aux réactions de Vernes (2), de Meinicke (opacification), de Hecht-Mutermilch et de Kahn, dont :

a) 196 comparativement aux méthodes de Vernes et Meinicke :
b) 223 comparativement aux méthodes de Hecht-Mutermilch, Meinicke et Kahn.

a) GROUPE VERNES, MEINICKE, CAMPHÈNE (196 sérum) :

78 sérum provenant de sujets sains ou atteints de diverses affections *non syphilitiques* se sont montrés négatifs avec les trois réactions employées.

57 sérum provenant de sujets *atteints de syphilis*, récente ou ancienne, traitée ou non traitée, se sont montrés positifs par les trois réactions.

61 sérum provenant de sujets *syphilitiques*, pour la plupart en

(2) Nous remercions l'Institut prophylactique du Dr Vernes d'avoir mis à notre disposition les résultats de leurs examens et les dossiers des malades.

cours de traitement, ont donné des résultats discordants, et notamment :

Réaction de Vernes	56 résultats positifs, soit 91,80 p. 100
Réaction de Meinicke	4 — — 4,63 —
Réaction au camphène	47 — — 75,05 —

b) GROUPE HECHT-MUTERMILCH, MEINICKE, KAHN, CAMPHÈNE (223 sérum) :

188 sérum se sont montrés négatifs par les quatre réactions employées.

15 sérum se sont montrés positifs par les quatre réactions.

14 sérum, provenant de sujets *syphilitiques*, se sont montrés *discordants* :

Hecht-Mutermilch	3 résultats positifs, soit 21,42 p. 100
Meinicke	9 — — 64,42 —
Kahn	11 — — 78,57 —
Camphène	11 — — 78,57 —

6 sérum, provenant de sujets *présumés non syphilitiques*, ont fourni des résultats *non spécifiques*, par une ou plusieurs techniques, comme il ressort du tableau suivant :

SÉRUM	HECHT	KAHN	MEINICKE	CAMPHÈNE	OBSERVATIONS	
1	n	+	+	+++	Dépression mélancolique; tentatives de suicide	
2	n	n	n	++	Troubles névrotiques, paraissant liés à des conflits affectifs; éthylosme.	
3	n	++	n	n	Syndrome délirant sur fond d'affaiblissement psychique.	
4	n	n	n	±	Ancienne épileptique.	
5	n	n	n	+	Crises pithiatiques.	
6	n	n	n	+	Troubles mentaux.	

Le pourcentage des réactions, *présumées non spécifiques*, par rapport au nombre total des sérum examinés, s'établit donc pour chacune des réactions de la façon suivante :

Hecht	0 p. 100
Meinicke	0,45 —
Kahn	0,90 —
Au camphène	2 —

Il est bien entendu que la syphilis ne peut être écartée avec certitude pour ces malades mentaux.

En résumé :

1° La réaction à l'antigène au camphène s'est montrée supérieure à la réaction d'opacification de Meinicke ;

2° Sa sensibilité est comparable à celle des meilleures réactions classiques ;

3° Sa spécificité est dans les limites normales.

II. — RÉACTION A L'ISOBORNÉOL.

L'isobornéol est un alcool secondaire, de formule

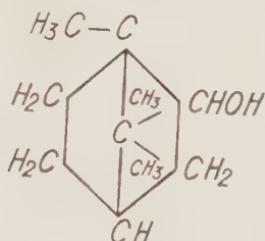


FIG. 3.

Il a été employé en solution à 1 p. 100 dans l'alcool à 90°.

L'antigène à l'isobornéol est obtenu en mélangeant l'extrait alcoolique de cœur de cheval, la teinture de baume de tolu et la teinture d'isobornéol d'après la formule ci-dessous, qui nous a donné les meilleurs résultats :

Extrait alcoolique de cœur au 1/3 dans l'alcool à 95° . . .	0,5 cm ³
Teinture-mère baume de tolu au 1/6 dans l'alcool à 95° . .	0,5 cm ³
Teinture d'isobornéol.	1 cm ³

La technique de la séro-réaction est ensuite similaire à celle de la réaction au camphène, avec la seule différence que la solution salée est à 2 p. 100 au lieu de 3 p. 100.

La lecture de la réaction à l'isobornéol est plus aisée que celle de la réaction au camphène.

Les sérums très positifs (++) floquent en clarifiant le mélange avec la formation d'un précipité abondant au fond du tube.

Les sérums positifs (++) floquent plus ou moins sans clarifier complètement le mélange.

Les sérums faiblement positifs (+) donnent un léger précipité au fond du tube, visible à l'œil nu ou, mieux encore, à la loupe, et qui opacifie le mélange après agitation.

Les sérums négatifs (0) ne floquent pas et les mélanges paraissent même plus transparents que ceux des tubes témoins, lesquels, d'ailleurs, ne sont pas indispensables.

1.036 sérum ont été examinés au moyen de cette nouvelle réaction comparativement aux réactions de Verne, de Hecht-Mutermilch, de Kahn, de Meinicke (opacification), dont :

- a) 214 sérum comparativement aux méthodes de Verne, de Hecht, de Kahn et de Meinicke ;
- b) 332 sérum comparativement aux méthodes de Verne et de Meinicke ;
- c) 495 sérum comparativement aux méthodes de Hecht-Mutermilch, de Meinicke et de Kahn.

a) GROUPE MEINICKE, HECHT, KAHN, VERNE, ISOBORNÉOL (214 sérum) :

74 sérum provenant de sujets sains ou atteints de diverses affections *non syphilitiques* se sont montrés négatifs par les quatre réactions employées.

47 sérum provenant de sujets atteints de syphilis, récente ou ancienne, traitée ou non traitée, se sont montrés positifs par les quatre réactions.

93 sérum provenant, pour la plupart, de sujets en cours de traitement ont donné des résultats *discordants*, que l'on peut résumer ainsi :

Réaction de Meinicke	14 résultats positifs, soit 13	p. 100
Réaction de Hecht-Mutermilch.	47	—
Réaction de Kahn	66	—
Réaction de Verne	72	—
Réaction à l'isobornéol	82	—

b) GROUPE MEINICKE, VERNE, ISOBORNÉOL (332 sérum) :

116 sérum provenant de sujets sains ou atteints d'affections *non syphilitiques* se sont montrés négatifs par les trois réactions employées.

89 sérum provenant de sujets *atteints de syphilis*, récente ou ancienne, traitée ou non traitée, se sont montrés positifs par les trois réactions.

127 sérum provenant de sujets *syphilitiques*, pour la plupart en cours de traitement, ont donné des résultats *discordants*, résumés de la manière suivante :

Réaction de Meinicke	7 résultats positifs, soit 5,5	p. 100
Réaction de Verne	92	—
Réaction à l'isobornéol	117	—

c) GROUPE MEINICKE, HECHT-MUTERMILCH, KAHN, ISOBORNÉOL (490 sérum) :

138 sérum ont été négatifs par toutes les réactions employées ; 23 sérum ont été positifs par toutes les réactions employées :

19 sérum, provenant de sujets *syphilitiques*, ont donné des résultats *discordants*, résumés comme ci-dessous :

Réaction de Meinicke	3 résultats positifs, soit 15,7 p. 100
Réaction de Hecht-Mutermilch	5 — — 26,3 —
Réaction de Kahn	17 — — 89,4 —
Réaction à l'isobornéol	19 — — 100 —

10 sérum, provenant de sujets présumés *non syphilitiques*, ont donné des résultats *non spécifiques*, résumés dans le tableau ci-dessous :

SÉRUM	HECHT	MEINICKE	KAHN	ISOBORNÉOL	OBSERVATIONS
1	<i>n</i>	<i>n</i>	±	<i>n</i>	Etat mélancolique résultant d'un drame passionnel; tendances agressives.
2	n	<i>n</i>	n	++	Alcoolique, mobilité de l'humeur; idées de persécution.
3	n	<i>n</i>	+	<i>n</i>	Syphilis non reconnue; jalousie morbide.
4	<i>n</i>	<i>n</i>	n	±	Etat dépressif; mouvements incohérents et désordonnés.
5	<i>n</i>	<i>n</i>	n	+	Débilité mentale.
6	<i>n</i>	<i>n</i>	+	+	Alcoolisme; aucun signe de spécificité.
7	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	±	Etat dépressif; deuxième crise assez intense.
8	<i>n</i>	<i>n</i>	++	+++	Pas de syphilis reconnue; placards psoriasiformes et eczématisés.
9	n	<i>n</i>	n	±	Vols irrésistibles.
10	<i>n</i>	<i>n</i>	n	±	Céphalées qui durent depuis 25 ans; absence de sinus frontal; hypertrophie osseuse crânienne par endroits.

Ces malades relevant de la psychiatrie, l'étiologie spécifique ne peut pas être écartée de manière absolue et nous inclinons à penser que, dans la plupart des cas, il s'agirait d'hérédo-syphilis. Même si l'on range toutes ces discordances dans la catégorie des réactions non spécifiques, le nombre en serait très réduit, soit 8 sérum sur les 1.036 sérum examinés, ou 0,77 p. 100.

TECHNIQUE APPLICABLE AU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN.

L'emploi de l'antigène isobornéolé peut être appliqué à l'examen des liquides céphalo-rachidiens ; la technique mise au point est la suivante :

Deux tubes, par réaction, reçoivent chacun 0,5 cm³ de liquide céphalo-rachidien ; l'un d'eux, le tube témoin, reçoit, en outre, IV gouttes de formol du commerce ; puis on distribue 0,5 cm³ de la suspension obtenue par le mélange rapide (à trois reprises)

de 1 cm³ d'antigène isobornéolé et de 10 cm³ d'eau physiologique à 9 p. 1.000, après leur chauffage préalable, pendant dix minutes, au bain-marie à 48°. On agite et on laisse les tubes à la température du laboratoire jusqu'au lendemain.

Les liquides très positifs (++) floculent en clarifiant le mélange ;

Les liquides positifs (+) floculent sans clarifier complètement le mélange, en formant un coagulum plus ou moins abondant semblable à de l'albumine cuite ;

Les liquides faiblement positifs (+) opacifient le mélange et forment des granulations fines comparables à celles que l'on observe dans la séro-réaction de Kahn ;

Les liquides négatifs (0) conservent au mélange son aspect initial (la lecture peut être facilitée par l'emploi du miroir concave).

115 liquides céphalo-rachidiens ont été examinés par cette méthode comparativement aux techniques de B.-W., de Meinicke et du benjoin colloïdal.

84 liquides ont été négatifs par toutes les techniques ;

5 liquides ont été positifs par toutes les techniques ;

23 liquides, provenant de sujets présentant des syndromes nerveux susceptibles d'être imputés à la syphilis, ont donné des résultats *discordants* que l'on peut résumer de la façon suivante :

Réaction de B.-W.	16 résultats positifs, soit 69,73 p. 100
Réaction de Meinicke.	3 — — 43,04 —
Réaction au benjoin	7 — — 30,43 —
Réaction à l'isobornéol.	20 — — 86,95 —

3 liquides, provenant de sujets *présumés non syphilitiques*, ont donné des résultats *discordants* que l'on peut résumer dans le tableau suivant :

N° LIQUIDE	B.-W.	MEINICKE	BENJOIN	ISOBORNÉOL	OBSERVATIONS	
					+	-
1	n	n	n	+	Syphilis? parésie faciale et pupille paresseuse.	
2	n	n	n	++	Syndrome dépressif; paraplégie; tentatives de suicide et de meurtre, 14 ans auparavant.	
3	n	+	n	++	Psychose maniaque dépressive; troisième crise. 37 ans.	

Il s'agit de 3 malades mentaux, pour lesquels la syphilis demeure une étiologie possible.

DISCUSSION.

Les réactions aux antigènes à base de camphre, de camphène et d'isobornéol réalisent trois nouvelles techniques de séro-diagnostic de la syphilis, dont la sensibilité est comparable ou supérieure à celle des réactions de Hecht, de Meinicke, de Kahn, de Vernes, et dont la spécificité se maintient dans les limites tolérées. Toutefois, il est à remarquer que les sérum examinés provenaient, pour la plupart, de malades mentaux et de consultants de l'Institut prophylactique. La spécificité de ces réactions doit donc encore être éprouvée vis-à-vis des sérum appartenant à des sujets atteints d'affections telles que le paludisme, la scarlatine, la broncho-pneumonie, etc., ainsi qu'à des sujets vaccinés contre la variole, lesquels donnent souvent des réactions non spécifiques avec les techniques habituelles.

A quel procédé convient-il de donner la préférence ?

D'emblée, nous éliminerons la réaction à l'antigène camphré, pour les raisons déjà indiquées.

En ce qui concerne la réaction à l'antigène au camphène, l'expérience a montré que, d'une part, elle cédait en sensibilité à la réaction à l'isobornéol et que, d'autre part, la lecture de celle-ci était plus aisée. La réaction à l'antigène isobornéol se recommande donc pour le séro-diagnostic de la syphilis, d'autant plus qu'en présence de sérum faiblement positifs, elle a donné très souvent un nombre de croix plus élevé que toutes les autres réactions.

Est-il nécessaire d'insister sur la simplicité de la technique, n'exigeant aucun matériel spécial, et sur la facilité de sa lecture ?

Comment expliquer le mécanisme de l'action de ces différents sensibilisateurs ?

Ce problème d'ordre physico-chimique paraît très complexe et ne peut, pour le moment, pas être élucidé ; toutefois, il a été constaté que l'extrait alcoolique de cœur additionné de camphre ou d'isobornéol et en l'absence de tolu, déterminait, en présence de sérum syphilitiques, une flocculation plus importante que le même extrait employé seul ; les flocculats ainsi obtenus, étant plus volumineux, se précipitent plus facilement, au contact du tolu, que les flocculats fins ou invisibles formés par l'extrait seul. Il y aurait une analogie entre l'action sensibilisante du camphre ou de l'isobornéol et celle du cholestérol dans la réaction de Sachs-Witebsky. Notre attention fut attirée sur la fonction alcool commune au cholestérol et à l'isobornéol, que l'on retrouve dans d'autres dérivés de terpènes, tels, par exemple, le *thymol* et le *menthol*, à partir desquels des antigènes préparés d'après une formule à peu près identique à celle décrite précédemment se sont montrés d'une sensibilité suffisante, mais inférieure à celle de l'isobornéol.

Mais, d'autre part, il faut remarquer que le camphène, qui est un hydrocarbure, étant aussi un sensibilisateur assez actif, la fonction alcool de l'isobornéol ne saurait donc tout expliquer, et la question du mécanisme d'action de ce corps reste posée.

CONCLUSIONS.

1. Des substances diverses, dérivées de terpènes, telles le *camphre*, le *camphène*, l'*isobornéol*, le *thymol*, le *menthol*, ajoutées au baume de tolu et à l'extrait alcoolique de cœur, forment des antigènes d'une sensibilité remarquable et d'une spécificité satisfaisante.

2. L'antigène à l'*isobornéol* s'est avéré supérieur, à tous les points de vue, aux autres antigènes.

3. La réaction de floéulation à l'*isobornéol*, plus sensible que les réactions de Hecht-Mutermilch, de Meinicke, de Kahn et de Vernes, peut être recommandée pour le séro-diagnostic de la syphilis, conjointement aux autres réactions sérologiques classiques.

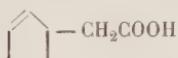
CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES ACIDES GRAS RAMIFIÉS

I. — SUR LES PROPRIÉTÉS TOXIQUES DE QUELQUES ACIDES RAMIFIÉS NON SATURÉS

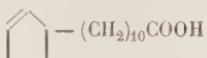
par A. SARTORY, JACQUES MEYER et PAUL CAGNANT.

(Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Microbiologie, Strasbourg.
Faculté des Sciences, Institut de Chimie, Strasbourg.)

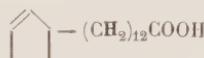
On a signalé dans la bibliographie [1] les propriétés toxiques de l'acide Δ 2-cyclopenténylacétique (I), en particulier l'apparition d'accidents convulsifs pouvant amener la mort chez le cobaye et le chien, après injection de faibles doses à ces animaux.



(I)



(II)

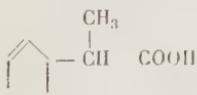


(III)

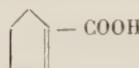
Des phénomènes semblables ont été observés [2] avec l'acide *hydnocarpique* et l'acide *chaulmoogrique*. L'hydrogénéation de la double liaison dans l'acide Δ 2-cyclopenténylacétique diminue fortement cette action toxique et la supprime complètement dans le cas des acides *hydnocarpique* et *chaulmoogrique*. Ce fait présente un grand intérêt, ces deux corps étant les seuls agents chimio-thérapeutiques actifs employés actuellement dans le traitement de la lèpre et les acides hydrogénés correspondants conservant leur activité antilépreuse.

Dans le but d'expliquer le mécanisme d'action physiologique des acides non saturés cycliques [3] et les relations entre l'activité toxique et la constitution chimique, nous avons étudié comparativement les substances suivantes :

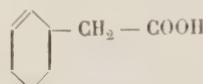
(I) Acide Δ 2-cyclopenténylacétique et son ester éthylique.
(IV) Acide α -méthyl- Δ 2-cyclopenténylacétique :



(V) Acide Δ 1-cyclopenténylecarboxylique et son ester éthylique :

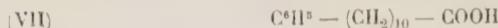


(VI) Acide Δ 2-cyclohexénylacétique et son isomère Δ 1 :



Esters éthyliques des acides hydnocarpique et chaulmoogrique et leurs dérivés hydrogénés correspondants.

Acide et ester éthylique de l'acide ω -phénylundécylque :



PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — Au moyen de chacun de ces produits nous avons injecté trois souris par voie sous-cutanée, à la base de la queue ($0,1 \text{ cm}^3$).

On a répété la même expérience sur un deuxième lot de trois animaux avec une dose de $0,6 \text{ cm}^3$ de chacun des produits étudiés.

Dans les deux séries d'essais, les résultats ont été concordants, prouvant soit l'atoxicité du produit, soit la toxicité de l'acide ou de l'ester expérimenté ; la dose minimum létale était de $0,1 \text{ cm}^3$ pour tous les produits toxiques.

Résultats. — Ont occasionné une mort foudroyante en quinze minutes : les esters éthyliques des acides hydnocarpique et chaulmoogrique à la dose de $0,6 \text{ cm}^3$. Leurs dérivés hydrogénés sont à peu près sans action.

Ont occasionné une mort plus tardive (trois à six heures après l'injection) :

L'acide Δ 2-cyclopenténylacétique et son ester,

L'acide α -méthyl- Δ 2-cyclopenténylacétique,

L'acide 2-cyclohexénylacétique et son isomère Δ 1.

L'acide Δ 1-cyclopenténylecarboxylique et son ester sont un peu moins actifs que l'acide Δ 2-cyclopenténylacétique aux mêmes doses.

Enfin l'acide ω -phénylundécylque et son ester éthylique sont totalement inactifs, même à la dose de $0,6 \text{ cm}^3$.

Les symptômes pathologiques sont identiques pour tous les corps étudiés : convulsions presque extraordinaires : donc action violente sur le système nerveux central, occasionnant une diminution de la fréquence cardiaque, élévation de la pression artérielle, spasmes respiratoires très accentués, vaso-constrictions arrêtant surtout les mouvements péristaltiques normaux du tractus digestif.

Dans les cas de mort tardive, nous constatons en outre une action hémogénique : diathèse hémorragique et formation de méthémoglobine.

A l'autopsie nous avons remarqué également une hémorragie cérébrale et nous insistons sur l'absence d'hypertrophie des surrénales. Celles-ci ont en moyenne le même poids que celles des souris non traitées par ces acides ou ces esters.

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — Nous avons effectué les essais suivants sur six cobayes sains au moyen de l'ester de l'acide hydnocarpique et l'acide Δ 2-cyclohexénylacétique.

a) Injection de chacun des deux produits par voie sous-cutanée à la dose de 1 cm³.

b) Injection par voie intrapéritonéale de 0,2 cm³ d'abord, puis de 0,6 cm³ après une heure.

c) Application par voie percutanée (technique de Moro) de 0,2 cm³ à travers la peau rasée et flambée de la région abdominale post-sternale.

Les résultats sont identiques à ceux des premiers essais : forte toxicité, convulsions et mort rapide.

A l'autopsie, fait important à retenir : on ne constate aucune caséification ni tuberculisation.

TROISIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — Des badigeonnages répétés au moyen de l'acide Δ 2-cyclopenténylacétique de la peau rasée du cobaye sain ne produisent aucun phénomène cutané d'irritation, alors qu'un cobaye nettement tuberculisé (injection sous-cutanée de 0,001 mg. de bacille de Koch depuis quatre semaines) présente une réaction inflammatoire nette et reproductible.

De ces recherches nous croyons pouvoir tirer les conclusions suivantes :

1^o La position de la double liaison en Δ 1 ou Δ 2 et la nature du cycle (5 ou 6 atomes de carbone) n'interviennent pas ou peu dans l'intensité des phénomènes toxiques déclenchés par les acides ω -cyclénylalcanoïques, la longueur de la chaîne grasse portant le carboxyle ne semble pas non plus intervenir considérablement dans cette action. La fixation directe du carboxyle au cycle non saturé présente une faible importance.

2^o Le mécanisme de l'action physiologique de ces acides est le même : action sur le système nerveux central, puis sur les organes des centres respiratoires.

3^o Le remplacement d'un cycle non saturé par un groupement aromatique phényle supprime toute action toxique ; l'acide phénylacétique et l'acide ω -phénylundécylque n'ont pas d'action. La présence non seulement d'un cycle, mais d'une double liaison

éthylénique isolée dans ce cycle est donc nécessaire pour qu'il y ait action toxique.

4° Le fait que les esters des acides toxiques ont une toxicité de même ordre que les acides mêmes, exclut pour ces composés un mécanisme d'action physiologique par association (captation, par exemple, de certains enzymes par le carboxyle libre) et n'a donc pas de rapport avec le mécanisme d'action des acides $\alpha\alpha$ -disubstitués que nous étudierons dans une prochaine note. Nous nous proposons également d'effectuer l'étude des acides comportant un cycle non saturé à 7 chaînons et bicycliques non saturés à 10 chaînons carbonés.

5° Ces acides toxiques n'ont pas d'action hémorragique, ni hypertrophiante directe sur la glande surrénale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BUU HOÏ et CAGNANT (P.). *Hoppe Seylers Zeitschr. physiol. Chem.*, 1943, **279**, 76 et *Bull. Soc. Chim.*, 1943, **10**, 141.
BERNHARD (K.) et MULLER (L.). *Hoppe Seylers Zeitschr. physiol. Chem.*, 1938, **256**, 85.
ROGERS. *Brit. med. J.*, 1916, Nr. 291, 550 et 1921, Nr. 314, 640.
- [2] BUU HOÏ et RATSIMAMANGA. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, **135**, 459.
- [3] Pour la préparation des acides cyclénylalcanoïques, voir :
BUU HOÏ et CAGNANT (P.). *Bull. Soc. Chim.*, 1942, **9**, 99 et 1943, **10**, 141.
HALLER et BAUER. *Ann. Chim.*, 1914, **1**, 15.
HALLER et CORNUBERT. *C. R. Soc. Chim.*, 1914, **158**, 302 et 1743.
EJKMAN. *Chem. Zentralbl.*, 1909, **2**, 2146.

L'EMPLOI DE LA GÉLOSE AU JAUNE D'ŒUF
POUR LA
MISE EN ÉVIDENCE DES BACILLES TUBERCULEUX
RÉSISTANTS A LA STREPTOMYCINE
OU A L'ACIDE PARA-AMINOSALICYLIQUE

par ALFRED G. KARLSON, D. V. M., Ph. D.,
Division of Experimental Medicine,

ANDRÉ-M. DELAUDE,
Fellow in Experimental Medicine,
Mayo Foundation

et

GERALD M. NEEDHAM, Ph. D.,
Section on Bacteriology, Mayo Clinic,
Rochester, Minnesota.

L'apparition de bacilles tuberculeux résistants à la streptomycine, chez certains des malades en traitement, constitue une des principales causes des échecs de cet antibiotique. Certaines tuberculoses d'emblée résistantes à la streptomycine apparaissent parfois, chez des sujets n'ayant jamais reçu l'antibiotique, mais ayant été en contact avec des malades porteurs de bacilles résistants. Pour ces raisons, la détermination de la sensibilité du bacille tuberculeux à la streptomycine donne des renseignements capitaux pour le clinicien et doit passer dans la pratique courante.

D'autre part, l'étude de la valeur antituberculeuse de nouveaux agents, tel l'acide *p-aminosalicylique*, doit comprendre la recherche de la présence éventuelle de bacilles tuberculeux résistants à ces agents, chez les malades ou les animaux de laboratoire traités par ces nouvelles médications.

Nous nous proposons donc de décrire la préparation et l'emploi d'un milieu solide qui nous a donné entière satisfaction pour la mise en évidence de bacilles tuberculeux résistants soit à la streptomycine, soit à l'acide *p-aminosalicylique*, soit à la fois à ces deux médications [1, 2]. Ce milieu est préparé par l'addition d'un jaune d'œuf et de différentes quantités de streptomycine ou d'acide *p-aminosalicylique* à chacun des flacons contenant 120 cm³ de

gélose liquéfiée stérile. Cette technique est comparable à celle de la préparation de la gélose au sang. La Tyndallisation ou les autres procédés de stérilisation sont inutiles après la répartition en tubes ; c'est dire que ce milieu est extrêmement simple à préparer et qu'il peut être utilisé dans des laboratoires ne possédant qu'un matériel de bactériologie réduit.

A. — MÉTHODES.

PRÉPARATION DE LA GÉLOSE. — Elle se fait de la manière habituelle. Nous employons la formule suivante : extrait de bœuf, 3 g. ; peptone, 10 g. ; glycérine, 10 cm³ ; eau distillée, 1 l. Le pH est ajusté à 7 (1). Le liquide ainsi obtenu est rendu homogène par chauffage et ensuite réparti dans des flacons de 150 cm³ environ, à raison de 120 cm³ par flacon. Les flacons, après stérilisation à l'autoclave, sont conservés à la glacière ou à la température du laboratoire, et recevront chacun un jaune d'œuf et la quantité de streptomycine ou d'acide para-aminosalicylique désirée, au moment de l'utilisation. Les volumes rapportés ici nous ont paru être ceux qui évitaient le plus la formation de mousse lorsque le jaune d'œuf est incorporé à la gélose.

PRÉPARATION DES JAUNES D'ŒUFS. — Des œufs frais, de poule, sont lavés à l'eau savonneuse et placés dans l'alcool à 70° pendant au moins quinze minutes. Chaque œuf est ensuite retiré de l'alcool, la petite extrémité de la coque brisée, et le blanc extrait, le tout à l'aide d'une pince stérile. Au moyen d'une pince stérile également, on crève le jaune, et on le rend homogène par agitation ; il est alors versé directement dans un des flacons contenant 120 cm³ de gélose liquéfiée par chauffage et ramenée à une température de 50° environ. Il est préférable d'ajouter à la gélose le médicament choisi, en solution aqueuse, avant l'incorporation du jaune d'œuf. A la température de 50°, la gélose est encore liquide et le jaune d'œuf ne se coagule pas. On agite pour obtenir un mélange homogène ; si une certaine quantité de mousse se forme, on s'en débarrasse en versant le liquide dans un second flacon stérile ; la mousse reste dans le premier récipient. Le milieu est alors réparti dans des tubes stériles que l'on incline ; cette opération doit être réalisée rapidement de manière à éviter la coagulation de la gélose avant sa répartition en tubes. Si cette coagulation se produisait, ne pas essayer de chauffer la gélose dans le flacon, car le jaune d'œuf se coagulerait et la strepto-

(1) Nous utilisons le « Dehydrated Nutrient Agar » préparé par Difco Laboratories, Detroit, Michigan.

mycine risquerait d'être inactivée. Les tubes munis d'un bouchon à vis sont ceux qui empêchent le mieux la dessiccation du milieu lorsqu'il est conservé longtemps.

En pratique courante, nous utilisons des concentrations de 1, 5, 10, 1.000 microgrammes de streptomycine par centimètre cube de milieu. Le volume d'un jaune d'œuf étant de 15 cm³ environ, les concentrations de l'antibiotique à ajouter à chaque flacon doivent être calculées en tenant compte du volume total : 120 cm³ de gélose + 15 cm³ de jaune d'œuf, soit 135 cm³. La streptomycine n'est pas inactivée par la température de la gélose (50°) ; elle conserve également ses propriétés en présence du jaune d'œuf, que le milieu soit conservé à la glacière ou à la température du laboratoire.

En raison de la faible solubilité de l'acide *p*-aminosalicylique, nous utilisons son sel de sodium (NaPAS). La solution aqueuse de ce sel est stérilisée par filtration et ajoutée à la gélose liquide, en quantités variables, de manière à obtenir des concentrations croissant du simple au double entre 0,006 et 6,4 mg. par 100 cm³ de milieu. Le médicament n'est pas inactivé par le milieu et conserve ses propriétés soit à la glacière, soit à la température du laboratoire.

ENSEMENCEMENT. — Les tests de sensibilité peuvent être faits par ensemencement direct des produits pathologiques (crachats, urine, liquide gastrique), s'ils sont extrêmement riches en bacilles et s'ils ont été traités comme pour une culture ordinaire de bacilles tuberculeux. L'échantillon doit être parfaitement homogène, de manière que chaque tube reçoive une quantité à peu près égale de bacilles. L'expérience nous a montré qu'habituellement et particulièrement lorsqu'il s'agit de malades traités par la streptomycine, une culture préalable est de beaucoup préférable. Les tubes du test de sensibilité sont ensemencés à partir de cette culture. Si les colonies obtenues sont friables, on peut ensemencer au fil de platine ; la répartition à la surface du milieu doit être faite avec le plus grand soin, de sorte qu'un amas bacillaire n'en impose pas pour une colonie lors de la lecture, quatorze jours plus tard.

Si la culture est sèche et peu friable, ce qui est le cas le plus fréquent, on fait une émulsion bacillaire. Quelques colonies sont broyées dans un mortier stérile, ou dans un tube à essai avec un agitateur de verre, et l'on ajoute ensuite 3 à 4 cm³ d'eau distillée ou de bouillon ordinaire, de manière à obtenir une émulsion contenant environ 1 mg. de bacilles tuberculeux par centimètre cube. La méthode ne nécessite pas une grande précision et des variations de 1 à 10 dans le nombre des bacilles ensemencés ne modifient pas les résultats de façon appréciable. On peut toutefois comparer les émulsions ainsi réalisées avec une émulsion standard

contenant 1 mg. de bacilles par centimètre cube. Chaque tube de milieu recevra finalement 0,1 cm³ de la suspension et sera placé à l'étuve à 37° pendant quatorze jours.

B. — RÉSULTATS.

TESTS DE SENSIBILITÉ A LA STREPTOMYCINE. — Après quatorze jours d'incubation, on peut noter soit la résistance de la culture, qui est alors la concentration maxima de streptomycine permettant la croissance, soit la sensibilité de la culture, c'est-à-dire la concentration minima de streptomycine inhibant cette croissance.

Le milieu que nous préconisons donne entière satisfaction et habituellement après deux semaines, une croissance très importante est observée dans le tube témoin, comme on peut le voir sur les figures 1 et 2. Parfois les résultats peuvent être plus rapides et lus après sept à dix jours. Si, par contre, il n'y a pas de croissance après quatorze jours, nous préférons faire un second test que conserver plus longtemps le premier à l'étuve.

Les cultures isolées de 551 malades jamais traités par l'antibiotique ont poussé seulement dans le tube témoin ou le tube contenant 1 microgramme de streptomycine par centimètre cube de milieu.

Au cours du traitement, les bacilles tuberculeux streptomycino-résistants peuvent apparaître soit rapidement, soit progressivement. Très souvent ils sont capables de pousser dans un milieu contenant 1.000 microgrammes ou plus de streptomycine par centimètre cube.

TESTS DE SENSIBILITÉ A L'ACIDE *p*-AMINOSALICYLIQUE. — Les cultures isolées de 73 malades, jamais traités par cette médication, ont poussé seulement dans le tube témoin et les tubes contenant des concentrations égales à 0,006 et 0,012 mg. de NaPAS par 100 cm³ de milieu. Dix de ces cultures étaient cependant résistantes à la streptomycine. Les résultats étaient lus par deux fois : une première lecture était faite le quatorzième jour, une seconde le trentième, comme pour la culture de la figure 3.

Nous avons seulement trouvé des bacilles tuberculeux résistants *in vitro* à l'acide *p*-aminosalicylique chez 4 malades qui avaient été traités par ce médicament, sans association de streptomycine, pendant cinq à huit mois. Les cultures isolées de ces malades à la fin du traitement poussaient, comme on peut le voir sur la figure 4, dans un milieu contenant 3,2 mg de NaPAS par 100 cm³. Cette concentration est plusieurs centaines de fois



FIG. 1. — Culture streptomycino-sensible, isolée d'un malade non traité par l'antibiotique. La lettre C indique le tube témoin, les chiffres indiquent les concentrations de streptomycine en microgrammes, par centimètre cube de milieu. Photo prise après quatorze jours d'incubation à 37°.



FIG. 2. — Culture streptomycino-résistante. Photo prise après quatorze jours d'incubation. Seuls les tubes contenant 10 et 1.000 microgrammes de streptomycine par centimètre cube de milieu ont été employés, car le malade était connu depuis longtemps comme porteur de bacilles résistants.

égale à celle qui inhibait toute croissance au début du traitement. De plus, 2 de ces malades avaient des bacilles résistants à la streptomycine avant le début du traitement par l'acide *p*-aminosalicylique ; la figure 5 montre la culture isolée d'un de ces malades ; ces cultures, résistantes aux deux médicaments, poussent dans un milieu contenant 1.000 microgrammes de streptomycine



FIG. 3. — Culture sensible à l'acide *p*-aminosalicylique. Après trente jours, la croissance est observée dans le tube témoin et les tubes contenant 0,006 et 0,012 mg. de NaPAS par 100 cm³ de milieu. Un grand nombre de cultures de malades non traités par le NaPAS poussent seulement dans 0,006 (d'après Delaude et col.) [2].

par centimètre cube et des concentrations de NaPAS variant de 0,4 à 6,4 mg. par 100 cm³.

DISCUSSION. — Pour les tests courants de sensibilité du bacille tuberculeux à la streptomycine ou à l'acide *p*-aminosalicylique, nous préférions les milieux solides aux milieux liquides. Ils permettent d'apprécier plus facilement l'intensité de la croissance ; ils permettent de prélever des colonies isolées pour des études ultérieures, ils sont plus faciles à manipuler. Dans une série de 245 tests faits parallèlement sur gélose à l'œuf et dans le milieu liquide de Proskauer et Beck, 10 cultures n'ont poussé qu'en milieu solide. La gélose à l'œuf, contrairement aux milieux de Löwenstein et de Petragnani, ne nécessite pas la Tyndallisation, qui est toujours ennuyeuse à réaliser et qui risque d'inhiber l'action des agents thérapeutiques employés.



FIG. 4. — Culture résistante à l'acide *p*-aminosalicylique isolée d'un malade ayant reçu 930 g. de cette médication en cent soixante neuf jours. Après trente jours la culture pousse dans les concentrations de 3,2 mg de NaPAS par 100 cm³ (d'après Delaude et coll.) [2].

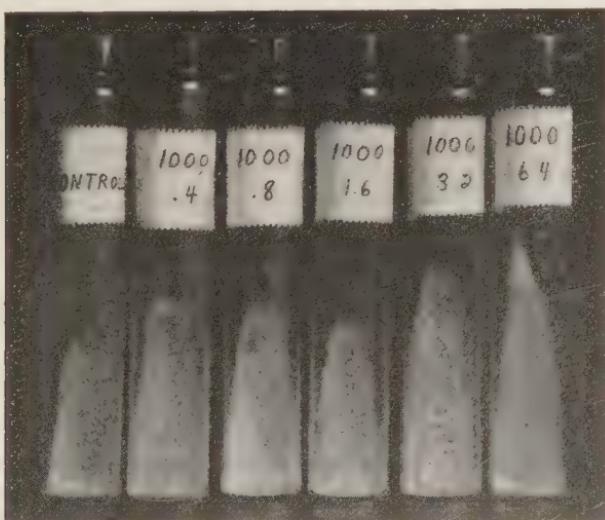


FIG. 5. — Culture résistante à la fois à la streptomycine et à l'acide *p*-amino salicylique. Ce malade a subi une première période de traitement par la streptomycine, et, plus tard, il reçut 10 g. de NaPAS par jour, pendant deux cent cinquante et un jours. Après trente jours la croissance est observée dans les tubes contenant 1.000 microgrammes de streptomycine par centimètre cube et des concentrations de NaPAS variant de 0,4 à 6,4 mg. par 100 cm³ de milieu.

RÉSUMÉ. — Une technique pour la détermination de la sensibilité du bacille tuberculeux à la streptomycine et à l'acide *p-aminosalicylique* a été décrite. Le milieu préconisé est constitué de gélose additionnée de jaune d'œuf et de l'agent thérapeutique intéressé. La Tyndallisation du milieu est inutile après la répartition en tubes. La lecture des résultats est plus facile et plus précise qu'elle ne l'est en milieu liquide.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KARLSON (A. G.) et NEEDHAM (G. M.). Determination of Streptomycin Sensitivity of Tubercle Bacilli by use of Egg-yolk Agar Medium. *Proceed. Staff Meet., Mayo Clin.*, 1948, **23**, 401-408.
- [2] DELAUME (André-M.), KARLSON (A. G.), CARR (D. T., FELDMAN (W. H.) et PFEUETZE (K. H.). Increase in Resistance of Tubercle Bacilli to Sodium *p-aminosalicylic Acid* : Observations on Cultures Isolated from Patients During Chemotherapy. *Proceed. Staff Meet., Mayo Clin.*, 1949, **24**, 341-346.

SUR LE MÉCANISME DE L'ACTION DE LA STREPTOMYCINE

II. — LA RÉSISTANCE A LA STREPTOMYCINE

par ROGER LINZ.

(*Laboratoire de Bactériologie de l'Université Libre de Bruxelles
et Laboratoire de Biologie clinique
de l'Hôpital universitaire Saint-Pierre, Bruxelles.*)

Les bactéries ne sont pas toutes sensibles à l'action bactériostatique de la streptomycine. Une souche est rarement insensible d'emblée, mais des variants résistants apparaissent facilement sous l'effet d'un traitement par l'antibiotique, soit *in vitro*, soit *in vivo* [26, 3]. L'objet du présent mémoire est l'étude de certains problèmes posés par la résistance acquise. On sait que celle-ci est héréditaire et varie rarement au cours des repiquages [6].

Les techniques expérimentales sont les mêmes que celles utilisées dans le premier mémoire [13].

★★

La notion de résistance est toute relative. Ainsi, on sait que, pour inhiber la multiplication, il faut introduire dans un milieu nutritif d'autant plus de streptomycine que l'ensemencement a été plus riche [5, 9] ; il s'agit cependant d'une seule et même souche microbienne, et l'on ne peut parler de résistance plus ou moins grande. D'autre part, la concentration bactériostatique (C. B.) varie avec le milieu nutritif utilisé [27, 24]. Aussi, dans tout ce qui suit, sauf indication spéciale, les C. B. correspondent-elles à des ensemencements de 5×10^4 germes par cm^3 , ou moins, dans du « bouillon nutritif Difco ».

On a décrit peu de différences entre les germes sensibles et résistants ; seul le comportement vis-à-vis de la streptomycine les distingue. Les autres différences, d'ailleurs inconstantes, sont peu caractéristiques : modifications de l'aspect microscopique [24, 8], de l'aspect des colonies [21], modifications de l'activité biochimique [22]. Il nous a semblé, en outre, que les variants résistants supportaient plus mal la conservation, même en glacière, que les souches sensibles dont ils sont issus : leurs cultures, surtout sur gélose, se stérilisent fréquemment en quatre à huit semaines. Murray et al. ont fait des observations analogues [22].

On connaît quatre moyens pour faire apparaître des variants résistants ; de chacun il existe diverses modalités. Ces quatre moyens sont les suivants :

1^o Lorsqu'on ensemence un grand nombre de bactéries sur milieu nutritif gélosé additionné de streptomycine, des colonies se développent qui se révèlent résistantes (cf. 7, p. ex.). Les colonies sont d'autant plus nombreuses que la streptomycine est moins concentrée ou que l'ensemencement a été plus riche.

2^o Si l'on ensemence des bactéries sensibles dans une série de tubes de bouillon contenant des concentrations croissantes de streptomycine, *a*, *b*, *c*, *d*, etc., les bactéries se sont multipliées, après vingt à vingt-quatre heures à 37°, dans certains tubes, *a*, *b*, *c*, par exemple. Si *a*, *b* et *c* sont suffisamment proches de la C. B. (*d*), les cultures de ces tubes ont acquis une faible résistance [18]. Prolongeons la durée de l'incubation. Certains tubes restés limpides, présentent à leur tour un développement microbien ; ces cultures sont fortement résistantes. Les nouvelles cultures ne se présentent pas toujours dans le tube *d* ou même *e* : il arrive que *d*, *e*, restent limpides et que *g*, par exemple, se trouble. La culture est d'autant plus résistante qu'elle a apparu plus haut dans la série. Si l'on fait faire un passage à ces cultures résistantes dans du bouillon additionné d'une concentration plus forte de streptomycine, on exalte encore la résistance. Après quelques passages, on peut obtenir des cultures insensibles à n'importe quelle concentration de l'antibiotique.

3^o Silver et Kempe [25] ont montré que des bactéries sensibles peuvent devenir « extrêmement résistantes par culture en série sur membranes allantoïdes d'œufs embryonnés additionnés de quantités de streptomycine constantes et inférieures à la concentration bactériostatique ». On obtient, de même, des souches très résistantes si on fait des passages successifs en bouillon contenant des concentrations constantes et minimes de streptomycine (1/500 à 1/1.000 de la C. B.) [41].

4^o Dans les 3 cas précédents, les bactéries, pour donner naissance à des résistants, doivent se multiplier [16]. Là où elles sont restées en présence de streptomycine, sans se multiplier, bien que vivantes, elles sont restées sensibles [17]. Un autre moyen de faire apparaître des résistants permet en même temps d'analyser ce qui se passe.

Des bactéries sensibles (*Ps. aeruginosa* R) sont mélangées en suspension épaisse et non proliférante (1) avec de la streptomycine (1.000 µ par centimètre cube). On sait que, dans ces condi-

1) On obtient les mêmes résultats, que l'on mette les bactéries en suspension dans du bouillon très dilué [14] ou qu'on les lave et les mette en suspension dans de la solution salée physiologique.

tions, la streptomycine se fixe sur les cellules et, par là, produit irréversiblement l'effet bactériostatique [13]. Mais elle modifie, en même temps, les bactéries, de sorte que certaines deviennent résistantes [15]. En effet, lavées jusqu'à ce que toute trace d'antibiotique non fixé ait disparu, ces bactéries, restées encore sensibles à $0,1 \gamma/cm^3$ à ce moment, deviennent résistantes lorsqu'on les cultive à 37° en bouillon pur.

Mais ici, également, la résistance ne se manifeste qu'à mesure qu'elles se multiplient : elles sont inhibées par $0,1 \gamma/cm^3$ après quatre et même huit heures d'incubation, mais seulement par $80 \gamma/cm^3$ après vingt-quatre heures, et par $312 \gamma/cm^3$ après quarante-huit heures. Cette expérience permet ainsi de distinguer trois phases dans l'évolution vers la résistance. Dans la première, les bactéries fixent de la streptomycine. La deuxième est un temps de latence, où la souche, bien qu'au début de sa multiplication, a conservé une sensibilité apparente ; cette phase couvre les premières heures (jusqu'à la huitième, au moins) de l'incubation en bouillon. Enfin, dans la troisième phase, les bactéries, ou leurs descendants, manifestent les propriétés résistantes. On peut dire, si on admet que la résistance est induite, que les bactéries destinées à devenir insensibles, sont dans un état de résistance larvée pendant les deux premières phases ; celles-ci correspondent sans doute aux modifications métaboliques qui vont permettre aux germes de devenir indifférents à la streptomycine.

Mettons en parallèle avec les 3 phases ci-dessus décrites les 2 phases que nous avons distinguées dans l'action bactériostatique : une première, durant laquelle la streptomycine se fixe sur les bactéries, et une seconde, où l'effet inhibiteur proprement dit se manifeste [13]. La première phase est identique dans les 2 cas.

Lorsqu'on met des bactéries sensibles en contact avec la streptomycine, qu'on les lave et les ensemence en bouillon pur, leur évolution vers la résistance est très curieuse. En effet, si on soumet périodiquement cette culture à des isolements et qu'on teste la sensibilité des colonies à l'antibiotique, on observe les faits suivants. Toutes les colonies obtenues à partir de la culture de quatre ou huit heures à 37° sont sensibles à $0,1 \gamma$ par centimètre cube. Quand la culture est âgée de un, deux ou trois jours, au contraire, elle est hétérogène et fournit un mélange de colonies fort résistantes (non inhibées par 100γ par centimètre cube), moyennement résistantes (inhibées par 10γ par centimètre cube) et sensibles (inhibées par $0,1$ à 1γ par centimètre cube) ; la proportion de ces colonies, au troisième jour, est respectivement de 10,4 et 6 sur 20 colonies testées. Quand la culture vieillit davantage, au cinquième jour, par exemple, toutes les colonies sont résistantes. A leur tour, les colonies sont homogènes, les colonies-filles de chacune ayant toutes la même sensibilité [19].

Cette constatation est remarquable : rien de pareil ne se produit lorsqu'une souche devient résistante par culture en présence de streptomycine. Elle conduit, en outre, à distinguer entre la résistance d'une souche et la résistance des germes qui la composent.

L'acquisition de la résistance par des bactéries non proliférantes, niée par Klein et Kimmelman [7], est donc possible, mais elle est larvée et ne se manifeste qu'après un temps de latence au cours duquel les cellules se multiplient. Elle est constante pour la souche de *Ps. aeruginosa* R, mais ne se produit pas dans le cas d'*Esch. coli* 7S, par exemple.



Deux théories cherchent à rendre compte de l'origine de la résistance à la streptomycine. Selon l'une (sélection de résistants spontanés), des individus résistants existent naturellement dans toute souche sensible ; lorsqu'on introduit l'antibiotique dans le milieu de culture, seuls ceux-ci se multiplient et constituent la population nouvelle. La résistance est donc indépendante du contact avec la streptomycine. Selon d'autres théories, au contraire, c'est ce contact qui modifie les germes et les rend activement résistants. Il y aurait donc *induction* ; l'induction peut se faire par adaptation progressive ou par mutation brusque.

L'étude de l'origine de la résistance est difficile. En effet, on ne peut distinguer les résistants des sensibles que par l'épreuve de la croissance en présence de streptomycine. Les germes résistants qu'on croit avoir ainsi « sélectionnés » ont, en réalité, subi l'influence de l'antibiotique, et on pourrait prétendre que leurs qualités ont été acquises grâce à cette influence. Des observations sur des souches dérivées de cellules uniques, isolées par micromanipulation, sont désirables, mais ne résoudront sans doute pas cette difficulté.

C'est la théorie de la sélection qui a le plus d'adeptes [1, 2, 6, 7, 28]. Son argument principal est que, si on ensemence un nombre suffisamment grand de bactéries sur un milieu contenant une forte concentration de streptomycine, des colonies résistantes se développent. Les germes spontanément résistants sont rares, en effet, et d'autant plus rares qu'on considère une concentration plus élevée d'antibiotique. Or, l'expérience est possible d'une critique : l'emploi d'une grande masse de bactéries peut s'accompagner d'un effet antagoniste de l'action bactériostatique, permettant à certains germes de se multiplier.

Pour démontrer cet effet, on prépare une suspension épaisse de bactéries. On la divise en deux parties, dont l'une est stérilisée par chauffage à 56° ou à 62°. On introduit environ 5×10^4 germes

vivants dans des tubes contenant 1 cm³ de bouillon et de la streptomycine en concentration croissante (série A) ; on ensemence de même une série de tubes toute identique, sauf que chaque tube contient, en outre, 10⁸ à 10⁹ germes tués (série B). Il faut quatre à huit fois plus de streptomycine dans la série B que dans la série A pour inhiber la multiplication. L'influence antagoniste des bactéries chauffées n'est pas spécifique, elle s'exerce aussi sur des bactéries d'autres espèces. Elle est indépendante de la concentration de streptomycine à laquelle les bactéries sont sensibles [10, 12, 17]. Elle permet aux bactéries qui se sont multipliées en présence de concentration de streptomycine normalement bactériostatique, d'acquérir une certaine résistance [18].

Il est probable que l'influence antagoniste est plus forte lorsqu'elle est exercée par des suspensions bactériennes non altérées par la chaleur. Elle peut intervenir lorsqu'on ensemence une gélose de façon massive : elle permet à quelques individus de se multiplier, et leur descendance devient résistante. Ce n'est là, bien entendu, qu'une hypothèse.

Toutes les souches ne sont pas douées de l'influence antagoniste. Welsch [28] a montré qu'un staphylocoque dépourvu de cette propriété, donnait quelques colonies résistantes sur une gélose additionnée de streptomycine et ensemencée d'un grand nombre de germes.

Il y a d'ailleurs peu de doute que la sélection intervienne : des mutants spontanément résistants existent probablement. Mais ils sont très rares, peut-être plus qu'on ne l'admet. Ainsi, si de rares germes spontanément résistants au sein d'une population sensible étaient à l'origine de la résistance acquise par la souche, il faudrait qu'en ensemencant abondamment du bouillon contenant de la streptomycine, on vit facilement se manifester les résistants. Or, il n'en est rien si l'on prend la précaution de proportionner le volume du bouillon au nombre des bactéries, de façon à maintenir constante la concentration de celles-ci dans les différents mélanges [14].

La sélection n'explique pas tous les faits, et certains s'expliquent bien mieux par une induction. Voici ces faits :

1^o On a vu que, lorsque des bactéries se multiplient dans un milieu de culture additionné de streptomycine et où elles ont été inhibées pendant un ou plusieurs jours, elles sont fort résistantes. Pourquoi ce retard au développement microbien ? Les germes résistants se multiplient-ils plus lentement que les germes sensibles ? Il n'en est rien, comme le montre le cas typique suivant :

La souche sensible d'*Esch. coli* 2S (10⁴ germes par centimètre cube) est inhibée en bouillon à 37°, par 0,25 γ de streptomycine par centimètre cube (vingt-quatrième heure). Mais, le quatrième

jour, le bouillon contenant 2 γ par centimètre cube se trouble, ci le variant résistant ainsi obtenu n'est inhibé que par 12,5 γ par centimètre cube. On étudie le rythme de multiplication des variants sensibles et résistants en bouillon pur ou contenant de la streptomycine (deux concentrations : 1/16 de la concentration bactériostatique, et 2 γ par centimètre cube). Les résultats qui figurent au tableau ne permettent pas d'attribuer le retard à l'apparition des germes résistants à une multiplication plus lente. Si un seul germe capable de se multiplier malgré la présence de 2 γ de streptomycine par centimètre cube avait existé dans la population initiale, le bouillon eût été trouble le lendemain.

TABLEAU. — Cultures des variants sensibles et résistants d'*Esch. col.*, γS en bouillon pur ou additionné de streptomycine. Nombre de bactéries par centimètre cube.

MOMENT des numérasions	VARIANT SENSIBLE			VARIANT RÉSISTANT		
	Bouillon pur	Bouillon + S 0,016 γ/cm ³	Bouillon + S 2 γ/cm ³	Bouillon pur	Bouillon + S 0,8 γ/cm ³	Bouillon + S 2 γ/cm ³
0'	2×10^2	2×10^2	2×10^2	1×10^3	1×10^2	1×10^2
2 heures. . .	3×10^2	5×10^2	2×10^2	3×10^3	3×10^2	1×10^2
4 heures. . .	7×10^3	1×10^4	2×10^2	2×10^3	7×10^2	2×10^2
6 heures. . .	1×10^5	4×10^4	1×10^2	9×10^4	3×10^3	6×10^2
8 heures. . .	1×10^6	5×10^5	2×10^2	3×10^5	7×10^4	1×10^4
24 heures. . .	4×10^9	3×10^9	$1,5 \times 10^2$	6×10^9	4×10^9	4×10^9

Le retard est donc dû à une autre cause : le germe résistant n'existe pas au départ, il est né au cours de l'incubation. Il faut admettre que les bactéries se sont transformées et que cette transformation a demandé du temps. Nous n'avons aucune connaissance sur la nature de la transformation.

2° Miller et Bohnhoff [21] ont, les premiers, décrit des variants bactériens que Paine et Finland [23] ont justement dénommés *dépendants*. Ces variants, obtenus par culture de germes sensibles sur milieu additionné de streptomycine, non seulement sont insensibles à l'action bactériostatique de celle-ci, mais encore ne se multiplient pas, ou se multiplient mal sur milieux qui en sont dépourvus. Bien que Miller et Bohnhoff admettent, ici encore, que les dépendants résultent d'une sélection, peut-on partager leur opinion ? Est-il probable que, spontanément, des méningocoques, par exemple, existent qui soient adaptés à une circonstance aussi

fortuite et aussi peu naturelle que l'introduction de la streptomycine dans leur métabolisme, cette adaptation étant si stricte que, sans la streptomycine, ils ne peuvent se multiplier ? Ne doit-on pas conclure, plutôt, qu'il s'agit ici d'un cas remarquable d'induction ? Paine et Finland [23], d'ailleurs adeptes de la théorie de la sélection, posent pourtant la question : les dépendants n'ont-ils pas remplacé un métabolite essentiel par une fraction de la molécule de la streptomycine ?

3^o L'acquisition de la résistance par passages répétés dans des milieux de culture additionnés de streptomycine à des concentrations sub-bactériostatiques et constantes, a déjà été mentionnée [25, 10]. Des concentrations aussi minimes que 1/500 ou 1/1.000 de la C. B. suffisent. Dès le premier passage elles font disparaître uniquement des individus les plus sensibles et, par sélection, ne peuvent que diminuer la sensibilité de la souche de façon imperceptible. Il n'y a aucun motif pour que celle-ci diminue davantage lors des passages suivants, ni qu'elle atteigne les niveaux étonnantes qu'on observe. Or, la résistance acquise est sans proportion avec la concentration de streptomycine utilisée dans les passages : la C. B. passe, par exemple, de 0,78 à 500 γ par centimètre cube pour *Ps. aeruginosa* R en bouillon additionné de 0,001 γ de streptomycine par centimètre cube, et, après de nouveaux passages, à 10.000 γ par centimètre cube et plus. La sélection ne peut expliquer cela.

Il est indifférent, à chaque passage, d'ensemencer un grand (10^8 à 10^9) ou petit (10^4) nombre de bactéries. Le grand nombre ne favorise donc pas l'apparition de cette résistance, comme ce serait le cas si la sélection jouait. Le degré de résistance obtenu est très inégal et la résistance est atteinte de façon inégalement rapide [20].

Il est probable qu'on a affaire, dans ces cas, à une résistance par mutation induite. Même des partisans de la théorie de la sélection, comme Yegian et Vanderlinde [29] admettent dans des observations analogues, que la sélection des résistants « facilite peut-être la production de formes plus résistantes encore par mutation ».

4^o Au lieu de faire des passages en série, on peut mêler une suspension épaisse de bactéries en bouillon (environ 10^{10} germes par centimètre cube) avec de la streptomycine, porter le mélange à 37° et déterminer périodiquement la sensibilité. Aussitôt que la multiplication des microbes est suffisante (huit heures), des résistants apparaissent [16].

On peut voir là un résultat de la sélection, si la streptomycine a été utilisée en concentration relativement élevée (10 γ par centimètre cube), mais l'influence de la sélection est exclue lorsqu'on mélange, à la suspension microbienne épaisse en bouillon, l'anti-

biotique en concentration minime, par exemple moins de 1,500 de la C. B. Or, dans une pareille expérience également, la culture devient résistante [16].

5° Après un contact passager et bref avec la streptomycine, une bactérie sensible (*Ps. aeruginosa* R)ensemencée en bouillon sans antibiotique donne naissance à une culture résistante [15]. On a vu que cette expérience offre deux caractères remarquables.

a) C'est en bouillon pur, sans streptomycine, que la résistance apparaît. La sélection, si sélection il y a, n'intervient donc pas pendant l'incubation en bouillon, mais auparavant, lors du contact des bactéries avec l'antibiotique. Cependant, il n'y a pas d'effet bactéricide appréciable : aux erreurs d'expérience près, la numération montre le même nombre de germes dans la suspension avant et après traitement par la streptomycine. Voyons si les sensibles ont seulement été paralysés.

b) Un temps de latence est nécessaire pour que les résistants se manifestent. Des tests de sensibilité montrent, en effet, que la culture est restée sensible après quatre et huit heures d'incubation à 37°, et qu'elle est devenue résistante après vingt-quatre heures. Or, si *Ps. aeruginosa* R ne s'est encore que peu ou pas multiplié après quatre heures (environ une fois et demie), il s'est fort multiplié à la huitième heure (environ 100 fois). Cependant, la culture est restée sensible. Si la sélection avait agi, en paralysant les germes sensibles, la culture eut dû donner une avance considérable aux résistants dont le rythme de multiplication, on le sait, est presque aussi rapide que celui des sensibles. C'est le contraire, cependant, qu'on constate : seuls les sensibles se sont multipliés, les résistants sont inapparents pendant les huit premières heures. Il faut donc conclure qu'ils naissent aux dépens de germes apparemment sensibles après un long travail de réorganisation des cellules. Bien plus, ou bien les sensibles cessent, à un certain moment, de vivre, ou bien de nouvelles cellules, très tardivement, se transforment en résistantes : on sait qu'entre le troisième et le cinquième jour, les sensibles semblent parfois avoir complètement disparu [10].

La simple co-existence entre sensibles et résistants dans les premiers jours d'incubation, prouve que les conditions ne sont pas défavorables à la multiplication des premiers.

Par quel processus la streptomycine induit-elle la résistance ? Y a-t-il une adaptation progressive et continue (cytoplasmique, selon Hinshelwood [4]) ou des mutations induites, brusques ? Des considérations développées ailleurs [20] montrent que l'adaptation continue et la mutation interviennent ensemble : dans les expériences où des bactéries sont soumises à des passages successifs en bouillon additionné de traces de l'antibiotique, la résistance augmente régulièrement pendant quelques passages, puis une

mutation brusque la porte à un niveau très élevé, et la progression régulière et plus lente reprend ensuite.

De ce qui précède, on semble autorisé à conclure que la résistance acquise à la streptomycine n'est pas toujours due à la sélection de mutants spontanés dans une souche sensible, mais que fréquemment elle est provoquée, induite, activement par l'antibiotique.

RÉSUMÉ

1° Les conditions dans lesquelles une souche bactérienne sensible devient résistante à la streptomycine sont décrites. La multiplication est nécessaire pour que la résistance se manifeste.

2° Par contact passager d'une suspension non proliférante avec l'antibiotique, et culture ultérieure en bouillon pur, on peut distinguer trois phases dans l'acquisition de la résistance : fixation de la streptomycine, temps de latence, manifestation de la résistance.

3° La théorie attribuant l'origine de la résistance d'une souche à la sélection de mutants résistants spontanés, n'explique pas tous les faits observés, qui, au contraire, s'expliquent par une induction active. Ces faits sont surtout : l'apparition tardive de résistants dans une culture inhibée pendant un ou plusieurs jours ; l'existence des variants « dépendants » ; la résistance acquise par passages répétés dans des milieux nutritifs contenant des concentrations minimes et constantes de streptomycine ; celle acquise par une seule culture en présence de concentrations faibles ; celle acquise par contact passager de cellules non proliférantes avec l'antibiotique et culture en bouillon pur, où elle ne se manifeste que tardivement et où les conditions, loin d'être sélectives, permettent la multiplication des germes restés sensibles. Dans ce dernier cas, les microbes sensibles semblent se transformer progressivement en résistants.

4° La résistance apparaît et croît, ou bien progressivement, ou bien par mutation brusque, ou bien des deux façons à la fois.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALEXANDER (H. E.) et LEIDY (G.). *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 329.
- [2] DEMEREC (M.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 63.
- [3] FINLAND (M.), MURRAY (R.), HARRIS (H. W.), KILHAM (L.) et MEADS (M.). *J. Am. med. Assoc.*, 1946, **132**, 16.
- [4] HINSHELWOOD (C. N.). *The chemical Kinetics of the bacterial cell*, 1946, Clarendon Press (Oxford).
- [5] HOBBY (G. L.), LENERT (F.) et HYMAN (B.). *J. Bact.*, 1946, **51**, 606.
- [6] KLEIN (M.). *J. Bact.*, 1947, **53**, 463.
- [7] KLEIN (M.) et KIMMELMAN (L. J.). *J. Bact.*, 1946, **52**, 471.
- [8] LEVADITI (C.) et HENRY (J.). *Rev. Immunol.*, 1947, **11**, 22 et 32.

- [9] LINZ (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 864.
- [10] LINZ (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1062.
- [11] LINZ (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1066.
- [12] LINZ (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1438 et 1440.
- [13] LINZ (R.). *Ces Annales*, 1949, **76**, 250.
- [14] LINZ (R.). *C. R. Soc. Biol.* [sous presse] (séance de la Soc. belge de Biol. du 30 avril 1949).
- [15] LINZ (R.). *C. R. Soc. Biol.* [sous presse] (*ibid.*, 28 mai 1949).
- [16] LINZ (R.) et LANE (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 577 et 726.
- [17] LINZ (R.) et LECOCQ (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1064.
- [18] LINZ (R.) et LECOCQ (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 542 et 544.
- [19] LINZ (R.), LECOCQ (E.) et WAUTERS (G.). *C. R. Soc. Biol.* [sous presse] (séance de la Soc. belge de Biol. du 25 juin 1949).
- [20] LINZ (R.), MARTIN (L.) et LECOCQ (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 728.
- [21] MILLER (C. P.) et BOHNHOFF (M.). *J. Am. med. Assoc.*, 1947, **130**, 485 et *J. Bact.*, 1947, **54**, 467.
- [22] MURRAY (R.), KILHAM (L.), WILCOX (C.) et FINLAND (M.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1946, **63**, 470.
- [23] PAIN (T. Fite, Jr) et FINLAND (M.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 207.
- [24] PRICE (C. W.), RANDALL (W. A.), CHANDLER (V. L.) et REEDY (R. J.). *J. Bact.*, 1947, **53**, 481.
- [25] SILVER (H. K.) et KEMPE (C. H.). *J. Immunol.*, 1947, **57**, 263.
- [26] WAESMAN (S. A.), REILLY (H. Chr.) et SCHATZ (A.). *Proceed. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, 1945, **31**, 157.
- [27] WALLACE (G. I.), RHYMER (I.), GIBSON (O.) et SHATTUCK (M.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1945, **60**, 127.
- [28] WELSCH (M.). *C. R. Soc. Biol.* [sous presse] (séance de la Soc. belge de Biol. du 28 mai 1949).
- [29] YEGIAN (D.) et VANDERLINDE (J.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 177.

LE MÉCANISME ENZYMATIQUE DE LA RÉACTION DE DÉSAMINATION COUPLEÉE CHEZ LES BACTÉRIES AÉROBIES STRICTES DU GROUPE *CL. SPOROGENES*

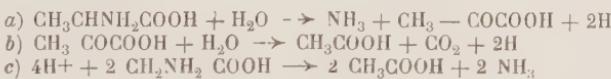
par B. NISMAN et G. VINET.

(*Institut Pasteur, Service des Anaérobies.*
[Annexe de Garches].)

La désamination couplée entre acides aminés donneurs et accepteurs d'H₂ observée par Stickland [1] est la principale réaction chimique par laquelle *Cl. sporogenes* tire l'énergie nécessaire à la croissance lorsqu'il se développe dans un milieu ne contenant que des acides aminés comme source de carbone et d'azote. Dans le cas de lalanine et de la glycine, cette réaction peut s'inscrire globalement :



Stickland a admis que la réaction 1 est la somme des réactions suivantes :



Toutefois ce schéma restait hypothétique car l'acide α -cétonique supposé n'avait pu être mis en évidence.

Nous avons montré dans un travail récent [2, 3, 4] que, contrairement à ce qui était admis [6] jusqu'à présent, *Cl. sporogenes* peut utiliser O₂ comme accepteur de H₂ dans l'oxydation de certains acides aminés et qu'un nombre important de bactéries anaérobies strictes présentent la même propriété. Dans le même travail [2, 3] nous avons caractérisé les acides α -cétoniques qui se forment en aérobiose à partir des substrats suivants : alanine, valine, leucine, isoleucine, norleucine, phénylalanine, méthionine, sérine, thréonine et cystéine. Seuls les acides α -cétoniques correspondant à la valine, la leucine, la norleucine [2], l'isoleucine, la phénylalanine [5] et la méthionine ont pu être isolés. Les autres

se trouvant en trop petite quantité, leur isolement n'a pas été poursuivi.

Dans le présent travail, nous fondant sur la nature de l'inhibition de la désamination couplée par l'arsénite de Na, nous avons pensé que le mécanisme de cette réaction pouvait être expliqué si l'on admettait qu'elle est effectuée par deux enzymes :

1^o Une déshydrogénase du type 1-amino-acide oxydase ;

2^o Une amino-acide réductase.

Si l'on considère en outre qu'il se forme des acides volatils comme produits finaux de cette réaction, cette dernière implique l'existence d'un troisième enzyme, une déshydrogénase des acides α -cétoniques.

La caractérisation des acides α -cétoniques comme intermédiaires de l'oxydation des acides aminés, des acides volatils formés au cours de la réaction [2] et l'étude du rapport O_2 consommé-NH₃ dégagé permet de rendre compte du mécanisme des réactions qui ont lieu en aérobiose et en anaérobiose.

L'objet du présent travail est donc :

1^o L'étude de l'inhibition par l'arsénite de Na de la désamination couplée.

2^o L'étude de la compétition en aérobiose entre les accepteurs « physiologiques » de H₂ et l'oxygène.

MÉTHODES ET TECHNIQUES.

PRÉPARATION DES SUSPENSIONS CELLULAIRES. — Des cultures de *Cl. sporogenes* (GO1) sur bouillon de cœur ou VF non glucosé, âgées de quatorze-seize heures, sont centrifugées. Le culot bactérien est lavé trois fois à l'eau physiologique stérile à 0° et les corps microbien sont finalement suspendus dans du tampon borate 0,04 M, pH = 7,3. La densité des suspensions est exprimée en milligramme d'N bactérien par millilitre de suspension. Les suspensions préparées de cette manière présentent une activité plus grande que les suspensions bactériennes préparées selon la technique exposée précédemment [2, 3]. Notons également que les bactéries sans substrat consomment moins d'O₂ dans ces conditions. Ceci peut être expliqué en admettant que les lavages enlèvent une grande partie des métabolites intracellulaires qui sont probablement la cause de la respiration des témoins.

Acides aminés. — Les acides aminés utilisés sont des produits Hoffmann-La Roche. Les acides aminés racémiques ont été employés à la concentration double de celle des isomères naturels.

L'A.T.P. utilisé est un produit « Schwartz Laboratories » (U.S.A.).

Les mesures d'O₂ et de H₂ absorbés ont été effectuées dans l'appareil de Warburg. Après la réaction le contenu des cupules

est déprotéinisé par CCl_3COOH (concentration finale 4 p. 100) et des échantillons sont prélevés pour le dosage de NH_3 et de RCO-COOH .

NH_3 a été dosé par la méthode de Raynaud [7] modifiée en micro-méthode par l'utilisation de réactifs N/100.

Les acides α -cétoniques ont été dosés par la méthode de Clift et Cook [8], compte tenu des micro-adaptations et des coefficients de récupération apportés à cette dernière par Blanchard, Green, Nocito et Ratner [9].

L'acétylphosphate a été dosé par la méthode de Lipmann et Tuttle [10].

RÉSULTATS.

ANAÉROBIOSE. — Inhibition de la réaction de désamination couplée par l'arsénite.

La désamination simultanée de lalanine et de la glycine, qui s'effectue sous l'influence des suspensions de *Cl. sporogenes*, où lalanine est oxydée et la glycine réduite, est inhibée par l'arsénite de Na comme il ressort du tableau I :

TABLEAU I. Inhibition de la réaction de désamination couplée par l'arsénite.

A : 100 μ moles de substrat donneur d' H_2 + 200 μ moles de substrat accepteur d' H_2 + 1 ml. de suspension (5 mg. N).

B : Identique à A, + arsénite de Na concentration finale M/1.000.

C : Comme A sans accepteur.

D : Comme A sans donneur.

E : Sans substrat.

Le volume est complété partout à 6 ml. avec du tampon borate 0,04M, pH-7,3. Les mélanges réactionnels sont agités sous vide à 37° pendant 120 minutes. Des échantillons sont prélevés après défécation par CCl_3COOH pour doser NH_3 et RCOCOOH . NH_3 et RCOCOOH provenant de l'autolyse bactérienne ont été déduits.

Résultats exprimés en μ moles.

	NH ₃		RCOCOOH
	Non corrigé (1)	Corrigé	
A : Alanine + glycine	298	278	0
Leucine + glycine	292	272	0
B : Alanine + glycine + arsénite.	27	7	0
Leucine + glycine + arsénite.	24	4	0
C : Alanine	38	18	0
Leucine	33	13	0
D : Glycine	68	48	0
E : Témoin	20	0	0

(1) Les valeurs non corrigées représentent NH_3 total, dosé. Les valeurs corrigées s'obtiennent par la déduction du témoin sans substrat.

Il apparaît d'après ce tableau que : a) le donneur, ainsi que l'accepteur d' H_2 sont légèrement attaqués individuellement ;

b) En l'absence d'arsénite la désamination couplée est totale en cent vingt minutes ;

c) L'arsénite de Na M/1.000 inhibe à 100 p. 100 la réaction ;

d) On ne décèle pas en anaérobiose les acides α -cétoniques correspondant aux acides aminés donateurs de H_2 .

L'inhibition par l'arsénite de cette réaction fut d'abord observée par Stickland [4]. Kocholaty et Hoogerheide [14], par contre, pensent que les résultats de Stickland sont inexacts car lalanine-déshydrogénase n'est pas inhibée par l'arsénite de Na. Nous allons voir que les résultats de ces auteurs sont exacts. Seules les interprétations diffèrent.

ACTION DE L'ARSÉNITE SUR LA DÉGRADATION DES ACIDES AMINÉS DONATEURS OU ACCEPTEURS D' H_2 .

L'oxydation ou la réduction des acides aminés individuels a été étudiée dans le vide en présence de colorants d'oxydo-réduction. Pour la désamination de lalanine nous avons employé le bleu de méthylène ($E'_\circ = + 0,011$ V). Le tableau II résume les résultats obtenus par cette technique.

TABLEAU II.

A : 50 μ moles d'alanine + B de M en concentration finale M/150 + 1 ml. de suspension ($N = 5,26$ mg.).

B : *Id.* + arsénite de Na (concentration finale M/1 000).

C : B mais sans B de M.

On complète le volume à 15 ml. par du tampon borate 0,04 M pH 7,3. Le mélange est agité à 37° jusqu'à complète décoloration du B de M. En fin de réaction on effectue des dosages de NH_3 et $RCOCOOH$ sur des échantillons. Les résultats sont exprimés en μ moles. NH_3 des témoins a été déduit.

	NH_3 apparu	TEMPS de décoloration
A.	—	30'
B.	51	30'
C.	0	—

On voit que l'arsénite de Na n'a pas d'action sur la déshydrogénération et la désamination consécutive du substrat.

L'inhibition, par l'arsénite, de la réaction globale de désamination couplée ne peut pas s'expliquer de cette façon. On peut supposer, en revanche, que l'arsénite inhibe la réduction de l'acide aminé donneur. C'est ce que nous avons cherché à vérifier en étudiant par la méthode de Thunberg la recoloration du leuco-dérivé de la phénosafranine en présence ou en absence d'arsénite de Na.

TABLEAU III (Thunberg). — Recoloration de la leucophénosafranine par la proline et la glycine en présence d'arsénite.

A : 50 μ moles de substrat + 1 ml. de suspension bactérienne (= 5,26 mg. N) + phénosafranine M/1.000 de concentration finale.

B : *Id.* + arsénite M/1.000 de concentration finale. Le volume est complété à 5 ml. avec du tampon borate 0,04 M pH 7,3.

++ : La glycine ou la proline est ajoutée lorsque le colorant est entièrement transformé en leucodérivé.

SUBSTRAT	TEMPS de recoloration
A { Glycine	30'
Proline	30'
B { Glycine + arsénite	∞
Proline + arsénite	∞

On constate, d'après le tableau III, que la phénosafranine qui se décolore presque instantanément au contact des suspensions bactériennes est réoxydée par l'acide aminé accepteur.

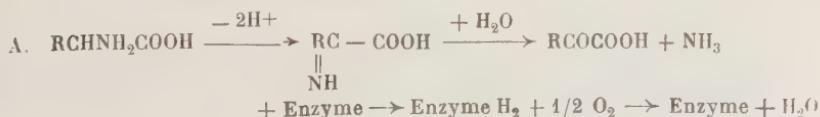
La réoxydation par la glycine ou la proline est totale en trente minutes. La recoloration n'a pas lieu en présence d'arsénite. C'est donc l'enzyme réduisant l'acide aminé accepteur qui est inhibé par l'arsénite.

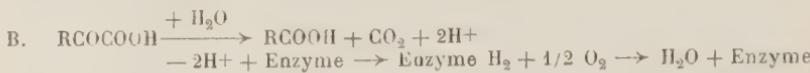
Dans les conditions physiologiques, les deux systèmes enzymatiques étant complémentaires, on conçoit très bien qu'en présence de l'inhibiteur qui empêche l'acide aminé accepteur de jouer son rôle, on inhibe complètement la réaction de désamination couplée.

AÉROBIOSE

COMPÉTITION ENTRE ACIDES AMINÉS ET OXYGÈNE. — Les acides aminés donneurs d'hydrogène, qui sont activés par les suspensions de *Cl. sporogenes* en anaérobiose, consomment de l'oxygène en présence des suspensions de cette même bactérie en aérobiose. Le rapport O_2/NH_3 pour les substrats suivants : alanine, valine, leucine, isoleucine, norleucine est très proche de 1. Nous avons écarté précédemment [2] l'éventualité de la formation de H_2O_2 au cours de l'oxydation des amino-acides parce que les tests de caractérisation de ce produit sont négatifs. Nous avons proposé le schéma suivant pour rendre compte de la dégradation de ces substrats :

Déshydrogénase de type *l*-amino-acide oxydase :



Déshydrogénase des acides α -cétoniques :

Les enzymes impliqués dans l'oxydation des acides aminés seraient donc :

- 1° Une déshydrogénase du type amino-acide oxydase ;
- 2° Une déshydrogénase des acides α -cétoniques ayant des similitudes avec la pyruvate-déshydrogénase de *Lact. delbrueckii* décrite par Lipmann [12].

Il était intéressant de voir si un accepteur acide aminé pourrait fonctionner simultanément avec O_2 et si, dans ces conditions, la consommation d' O_2 se trouverait modifiée. Une série d'expériences effectuées avec les couples suivants d'acides aminés donneurs et accepteurs de H_2 :

Alanine + glycine
Leucine + glycine

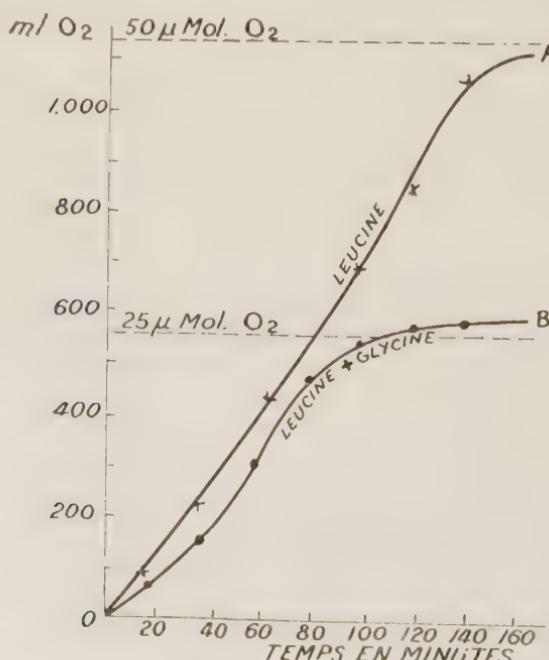


FIG. 4. — Compétition pour l'hydrogène entre O_2 et la glycine. A: 50 μ moles (1 ml) leucine + 1 ml de suspension ($\text{N} = 4,76 \text{ mg.}$); B: 30 μ moles (1 ml) leucine + 100 μ moles glycine. (Les courbes représentent la consommation d' O_2 corrigée.

montrent que la consommation d'oxygène baisse d'environ 40 à 45 p. 100, cependant que l'ammoniaque dégagé augmente en conséquence. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant et dans les figures 1 et 2.

TABLEAU IV. — Compétition pour l'hydrogène entre O_2 et la glycine.

Chaque cuve contient le substrat dans du tampon boraté 0,04 M pH 7,3 + 1 ml. de suspension bactérienne ($N = 4,76$ mg.). Volume total : 3 ml. Dans la partie centrale 0,2 ml. de KOH à 10 p. 100. Durée de l'expérience : 120 minutes. Température : 37°. Phase gazeuse : air. NH_3O_2 et $RCOOH$ exprimés en μ moles.

QUANTITÉ de substrat μ moles	O_2		NH_3		$RCOOH$	INHIBITION p. 100 Consommation de O_2
	non corrigé	corrigé	non corrigé	corrigé		
Alanine 50	53	47	67	54	0,7	
Alanine 50	35	29	98	85	1,0	39
+ Glycine 100						
Leucine 50	54	48	63	52	1,3	
Leucine 50	33,2	27,2	108,1	95,1	2,2	44
+ Glycine 100						
Témoin	6,0		43			
Glycine 100	6,0		43			

En aérobiose donc, comme en anaérobiose, la glycine peut être activée en accepteur de H_2 , la réaction étant plus intense dans le second cas, où l'hydrogène dégagé ne peut pas être dévié sur un autre accepteur. A l'air, en l'absence d'une source de H_2 (glycine seule) il n'y a pas de dégradation de l'acide aminé accepteur.

La réduction de la glycine peut s'écrire :



En outre, les observations résumées dans le tableau IV confirment le schéma proposé pour la dégradation des acides aminés donneurs d'hydrogène où nous avons admis le départ de 4 atomes d'hydrogène par molécule d'acide aminé, dont une partie sert à réduire la glycine, le restant pouvant être accepté par l'oxygène.

Le tableau V et la figure 2 exposent certains de nos résultats concernant des couples d'acides aminés :

Alanine + proline
Valine + proline.

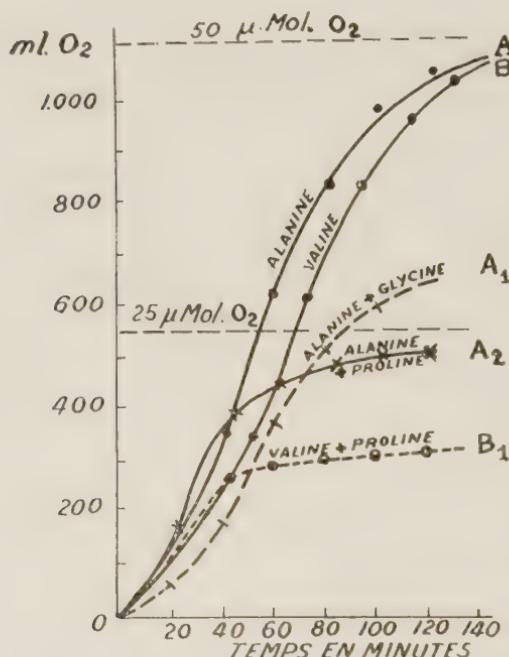


FIG. 2. — Compétition pour l'hydrogène entre O_2 et la glycine ou la proline.
 A: 50 μ moles de (*l* +) alanine + 1 ml. de suspension bactérienne (4,76 mg. N);
 A₁: 50 μ moles de (*l* +) alanine + 1 ml. de suspension bactérienne + 100 μ moles glycine;
 A₂: 50 μ moles de (*l* +) alanine + 1 ml. de suspension bactérienne (3,3 mg. N) + 100 μ moles proline;
 B: 50 μ moles de (*l* +) valine + 1 ml. susp. (5,3 mg. N);
 + 100 μ moles *l*-proline. (Les courbes représentent la consommation d' O_2 corrigée).

Dans ce cas aussi on constate une forte diminution de l'oxygène consommé dépassant celle qu'on remarque lorsqu'on utilise la glycine comme accepteur de H_2 .

Ces faits peuvent s'interpréter en admettant que la réduction de la proline est plus rapide que la réduction de la glycine.

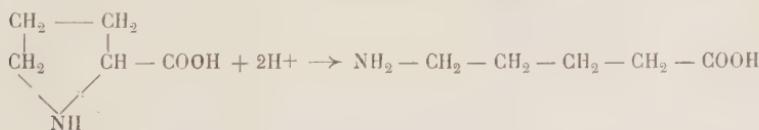
Il ressort toujours du même tableau que le taux de l'NH dégagé est identique en présence comme en absence de proline

TABLEAU V. — Compétition entre la proline et l'oxygène pour l'hydrogène dégagé.

Chaque cuve contient le substrat dans du tampon boraté 0,04 M pH 7,3 + 1 ml. de suspension bactérienne ($N = 5,3$ mg.). Volume total : 3 ml. Dans la partie centrale 0,2 ml. KOH à 10 p. 100 + papier filtre. Durée de l'expérience 120 minutes. Température : 37°. Phase gazeuse : air. NH_3 , O_2 et RCOCOOH exprimés en micromoles.

QUANTITÉ de substrat μ moles	OXYGÈNE		NH ₃		INHIBITION p. 100 Consommation de O ₂
	non corrigé	corrigé	non corrigé	corrigé	
50 alanine . . .	53	47	65,4	54,2	
50 alanine . . .	29	23	60,4	49,4	51
100 proline . . .					
50 valine . . .	51,4	45,4	66	54,8	
50 valine . . .	20	14	53,8	42,8	67
100 proline . . .	6	0	11	0	
Témoin	6	0	11,2	0	

ce qui est conforme au mode de la dégradation de la proline :



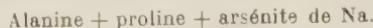
celle-ci étant réduite en acide α -amino-valérianique [1], mais non désaminée.

Nous dirons en résumé qu'à l'air les acides aminés accepteurs d'hydrogène sont en compétition avec l'oxygène pour l'hydrogène provenant de la déshydrogénéation du substrat. En présence des premiers, en aérobiose, deux réactions enzymatiques se poursuivent à des vitesses différentes suivant l'acide aminé accepteur utilisé.

ÉLIMINATION DE L'ACCEPTEUR PHYSIOLOGIQUE EN AÉROBIOSE PAR L'ARSENITE DE Na.

Nous avons relaté antérieurement que l'arsénite de Na n'inhibe pas les enzymes responsables de l'oxydation des acides aminés

en aérobiose. Or, comme cet inhibiteur inactive l'enzyme qui réduit les acides aminés accepteurs en anaérobiose, nous avons été amenés à vérifier que cette action pouvait également se manifester en présence d'oxygène. Nous avons donc étudié la consommation d' O_2 en présence du système suivant :



Les résultats sont rapportés dans le tableau VI et la figure 3.

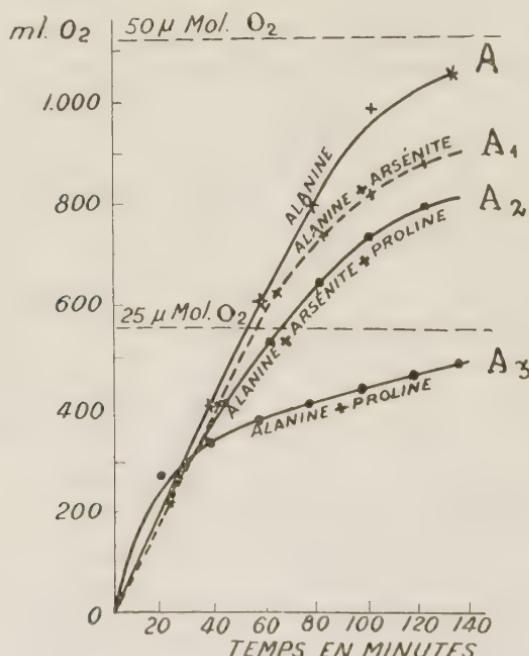


FIG. 3. — Elimination de l'accepteur physiologique en aérobiose par l'arsénite de Na. A: 50 μ moles alanine + 1 ml. de suspension (5,48 mg. N); A₁: 50 μ moles alanine + 1 ml. de suspension (5,48 mg. N) + arsénite M/1.000 de concentration finale; A₂: 50 μ moles alanine + 1 ml. de suspension (5,48 mg. N) + arsénite M 4.000 de concentration finale + 100 μ moles (*D*-proline); A₃: 50 μ moles alanine + 100 μ moles proline + 1 ml. de suspension bactérienne. (Les courbes représentent la consommation d' O_2 corrigée.)

Il apparaît d'après ces résultats que la présence d'arsénite M 1.000 (même concentration que dans le vide) suffit pour inhiber totalement la réduction de la proline et qu'il ne reste plus dans ces conditions que l'oxygène comme accepteur d'hydrogène.

C'est pourquoi la consommation d' O_2 avec le système alanine + proline + arsénite a la même valeur que pour le système alanine + arsénite. L'inhibiteur agit donc de la même manière en aérobiose et en anaérobiose.

LE RAPPORT α -CÉTO-ACIDE/AMMONIAQUE. — Les produits essentiels qui se forment en aérobiose sont des acides volatils [2] qui proviennent de la décarboxylation des acides α -cétoniques. Néanmoins le dosage par le bisulfite permet de déceler de petites quantités de ces derniers comme intermédiaires de l'oxydation des acides aminés (voir tableaux IV, V et VI).

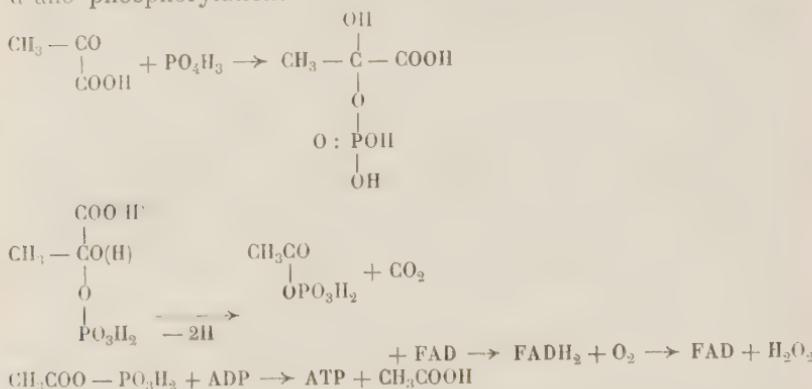
TABLEAU VI. — Action de l'arsénite de Na sur la consommation d' O_2 du couple alanine + proline.

Chaque cuve contient le substrat dans du tampon boraté 0,04 M pH 7,3 + 1 ml. suspension bactérienne ($N = 5,48$ mg.). Volume total : 3 ml. Dans la partie centrale, 0,2 ml. de KOH à 10 p. 100 + papier filtre. Inhibiteur à la concentration finale M/1.000. Température : 37°. Phase gazeuse : air. Durée de l'expérience 140 minutes. NH_3 , O_2 et $RCOOH$ exprimés en micromoles.

QUANTITÉ de substrat μ mole	O_2		NH_3		$RCOOH$	INHIBITION p. 100 consommation de O_2
	non corrige	corrige ^b	non corrige	corrige		
50 alanine	51,5	46,5	57,9	47,9	1,3	
50 alanine	24,8	20	55	45	1,6	37
+ 100 proline						
50 alanine						
+ 100 proline	40,4	35,4	50,3	40,3	1,2	40
+ Arsénite						
Alanine	44	39	47	37	1,6	48
+ Arsénite						
Témoin	5		10	0	0	
Proline. . . .	4,8		10	0	0	

La dégradation des acides α -cétoniques pourrait *a priori* se produire par un mécanisme analogue à la décarboxylation oxydative du pyruvate par le pyruvate-déshydrogénase de Lipmann [14] mis

en évidence chez *Lact. delbrueckii*, réaction qui s'accompagne d'une phosphorylation.



Dans notre cas [13], le pyruvate donne deux atomes d'hydrogène qui peuvent être acceptés soit par divers accepteurs tels que des acides aminés ou l'oxygène, soit encore dégagés en anaérobiose par l'action d'une hydrogénase qui transforme l'hydrogène activé en hydrogène moléculaire suivant la réaction : $2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2$.

La pyruvate-déshydrogénase présente chez *Cl. sporogenes* et *Cl. saccharobutyricum*, quoique pouvant utiliser O_2 comme accepteur de H_2 , doit cependant avoir d'autres propriétés que l'enzyme de Lipmann puisqu'elle ne forme pas de H_2O_2 .

DÉSAMINATION COUPLÉE ET PHOSPHORYLATION. — Nous avons étudié l'action de différents tampons sur la désamination couplée. Les suspensions bactériennes ont été à cet effet préalablement bien lavées (1) pour enlever le maximum de phosphate libre. Avec les tampons borate et phosphate préparés selon Sörensen, au même pH et même concentration moléculaire, on ne constate pas de différence d'activité enzymatique. Dans les deux cas la désamination s'effectue à la même vitesse, et elle est totale en deux heures. Le tableau suivant exprime les résultats obtenus :

On sait que lalanine est un acide aminé très important par l'acide α -cétonique auquel elle donne naissance — l'acide pyruvique — intermédiaire qui se trouve au carrefour du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines.

Lipmann [14] a montré qu'en présence de phosphate inorganique, le pyruvate de Na était dégradé suivant la réaction phosphoroclastique donnant de l'acétylphosphate, ce dernier pouvant

(1) Les bactéries sont lavées trois fois au ClNa physiologique à 0° et suspendues dans de l'eau bidistillée stérile et froide.

TABLEAU VII. — Action du tampon borate et phosphate sur la désamination couplée.

Conditions expérimentales identiques à celles du tableau I. Durée d'expérience : 120 minutes. 1 ml. de suspension 5,27 mg. N.

QUANTITÉ de substrat μ moles	TAMPON BORATE 0,04 M pH 7,2		TAMPON PHOSPHATE 0,04 M pH 7,2	
	Non corrigé	Corrigé	Non corrigé	Corrigé
Alanine 100	293	273	302	282
+ Glycine 200				
Alanine 100.	38	18	36	16
Glycine	65	45	61	41
Témoin	20		20	

ultérieurement être hydrolysé enzymatiquement. Nous avons [5], pour notre part, observé une accélération de la dégradation du pyruvate en présence d'ATP et de suspension de *Cl. saccharo-butyricum* ou de *Cl. sporogenes*. Toutefois, nous n'avons pu caractériser l'acétylphosphate que sous forme de traces. Les deux bactéries étudiées possèdent probablement une acétylphosphatase très puissante.

On pouvait donc s'attendre à observer une accélération de la dégradation de lalanine tant en aérobiose qu'en anaérobiose en présence d'ATP.

Le tableau VIII montre qu'il n'y a en fait pas d'accélération de la dégradation de lalanine, soit en aérobiose, soit en anaérobiose.

On constate qu'il n'y a pas non plus d'accumulation d'acétylphosphate aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose. Ces résultats ne sont pas probants puisque lorsqu'on opère avec des bactéries entières il est très difficile de mettre en évidence l'activité de certains cofacteurs, soit parce qu'il y a suffisamment de phosphate pour assurer la phosphorylation, soit encore à cause de l'imperméabilité cellulaire à certains corps, dont l'ATP. Quoi qu'il en soit, on ne constate pas d'action de l'ATP sur la désamination de lalanine.

LA RÉDUCTION DE LA GLYCINE PAR L'HYDROGÈNE MOLÉCULAIRE.

Hoogerheide et Kocholaty [45] ont montré que *Cl. sporogenes* peut réduire par l'hydrogène moléculaire un grand nombre de substrats parmi lesquels se trouve la glycine. L'existence d'une

TABLEAU VIII. — Action de l'ATP sur la dégradation de lalanine.
 Pour l'aérobiose, mêmes conditions expérimentales que dans le tableau IV.
 Pour l'anaérobiose, mêmes conditions expérimentales que dans le tableau I.
 Les réactions sont effectuées dans le tampon boraté. Durée de l'expérience : 120 minutes (1 ml. de suspension = 5,27 mg. N).

QUANTITÉ DE SUBSTRAT μ moles	NH ₃	O ₂	RCOCOOH	CH ₃ COOP ₃ H ₂
<i>Aérobiose :</i>				
Alanine 50	52	51,6	1,2	0,2
Alanine + 1.000 γ ATP	50	49	0,9	0,3
Témoin	41	5	0	0,2
<i>Anaérobiose :</i>				
	NH ₃		CH ₃ COOP ₃ H ₂	
Alanine + glycine	288		0,5	
Alanine + glycine + ATP 1.000 γ	276		0,7	
Alanine	20		0,3	
Glycine	43		0,3	
Témoin	20		0,3	

hydrogénase, enzyme découvert par Stephenson et Stickland [6] chez *Escherichia coli*, nous a permis d'étudier la consommation de H₂ par *Cl. sporogenes* en présence de glycine. Les résultats sont consignés dans le tableau IX.

TABLEAU IX. — Absorption de H₂ par *Cl. sporogenes*
 en présence de glycine.

La glycine dans du tampon borate pH 7,3, 0,04M + 0,5 ml. de suspension bactérienne (= 2,83 mg. N). Dans la partie centrale, 0,2 ml. KOH à 10 p. 100 + pyrogallol. Volume total : 3,0 ml. Phase gazeuse : H₂. Température : 37°. Durée de l'expérience : 140 minutes. Résultats exprimés en micromoles.

QUANTITÉ DE SUBSTRAT μ moles	NH ₃ FORMÉ		CONSOMMATION de H ₂		H ₂ /NH ₃	INHIBITION D. 100 Consommation μ- H ₂
	Non corrigé	Corrigé	Non corrigé	Corrigé		
50 glycine	58,7	50	30,8	27,6	0,55	
50 glycine + arsénite M/225	8,7	0	3,8	0,6		400
50 glycine + CNK M/300	58,7	50	29,9	26,1	0,52	
50 glycine + arsénite M/900	56,8	48,4	24,2	21	0,43	25,0
50 glycine + N ₃ Na M/75	43,6	4,9	6,4	3,2		90
Témoin	8,7		3,2			

*Cl. saccharobutyricum.*Mêmes conditions expérimentales que pour *Cl. sporogenes*.

0,5 ml. de suspension = 2,8 mg. N	NH ₃	H ₂
50 glycine.	1,18	0
Témoin	3,6	7

Ces expériences suggèrent les conclusions suivantes :

a) La glycine est réduite par l'hydrogène, toutefois l'H₂ absorbé n'est pas équivalent à l'NH₃ dégagé. Ceci paraît être dû à ce qu'une partie du substrat est réduite par l'hydrogène provenant des métabolites intracellulaires comme dans l'expérience résumée par le tableau I.

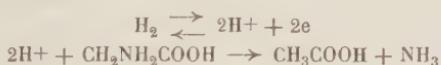
b) L'arsénite de Na, à la concentration M/900, inhibe de 25 p. 100 la réduction de la glycine. Pour atteindre une inhibition totale de la réaction, il faut augmenter la concentration de l'arsénite jusqu'à M/225.

c) D'autres inhibiteurs ont des effets variables sur la réaction :

L'azoture de Na M/75 inhibe presque complètement la réduction.

Le cyanure de K M/300 inhibe de 15 p. 100 la réaction.

d) La réduction de la glycine par l'hydrogène moléculaire peut s'écrire comme suit :



e) Notons que *Cl. saccharobutyricum*, toujours d'après le tableau précédent, ne possède pas d'amino-acide réductase. Cependant, on constate que cette bactérie peut activer H₂ moléculaire.

f) La réduction des acides aminés par l'hydrogène moléculaire peut être considérée comme une réaction différente de celle de désamination couplée, car cette dernière ne suppose pas une activation préalable de l'hydrogène par une hydrogénase.

DISCUSSION

RÔLE DE L'OXYGÈNE
COMME ACCEPTEUR NON PHYSIOLOGIQUE DE L'HYDROGÈNE.

1^o La présence chez un organisme anaérobiose strict de systèmes enzymatiques utilisant l'oxygène comme accepteur d'hydrogène est, de prime abord, déconcertante. Quel rôle ces enzymes pourraient-ils jouer dans le métabolisme de tels organismes ? Encore qu'il ne soit pas interdit de supposer que ce rôle soit nul ou négligeable, on doit, sans céder à aucun finalisme, reconnaître que ce n'est pas là une conclusion bien satisfaisante.

Les observations résumées dans le présent travail apportent une solution à ce problème. Comme nous l'avons vu, ces observations suggèrent que les mêmes systèmes enzymatiques qui, en aérobiose, utilisent O_2 , peuvent, en anaérobiose, utiliser un autre accepteur, en l'espèce un acide aminé. Mieux encore, dans certaines conditions, les deux accepteurs d'hydrogène peuvent être simultanément réduits et entrer en compétition l'un avec l'autre.

Notons ici que Barker [16] (communication personnelle) est arrivé à la même conclusion au cours de ses recherches sur la synthèse des acides en C_4 à partir des corps en C_2 .

2^o On sait que Stickland [4] avait le premier constaté que l'arsénite de Na inhibait la désamination couplée, mais ces résultats avaient été mis en doute par Kocholaty et Hoogerheide [11] qui n'avaient noté aucune inhibition par l'arsénite de la déshydrogénéation de lalanine en présence de bleu de méthylène.

Nos observations permettent de comprendre ces contradictions apparentes et suggèrent une interprétation assez précise du mécanisme de la réaction de Stickland.

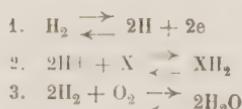
L'arsénite de Na n'inhibe pas, en effet, la déshydrogénéation de l'acide aminé, mais bien la réduction de l'accepteur.

En anaérobiose, ceci se traduit par l'inhibition de la réaction globale. En aérobiose, il n'y a pas de réduction de la glycine ou de la proline, en présence d'un acide aminé donneur et d'arsénite.

Ici encore l'inhibiteur rétablit la consommation d'oxygène à la valeur obtenue avec le donneur seul, parce que l'hydrogène dégagé ne peut être fixé que par un seul accepteur : l'oxygène.

Enfin, en atmosphère d'hydrogène, l'arsénite inhibe également la réduction par l'hydrogène moléculaire de l'acide aminé accepteur.

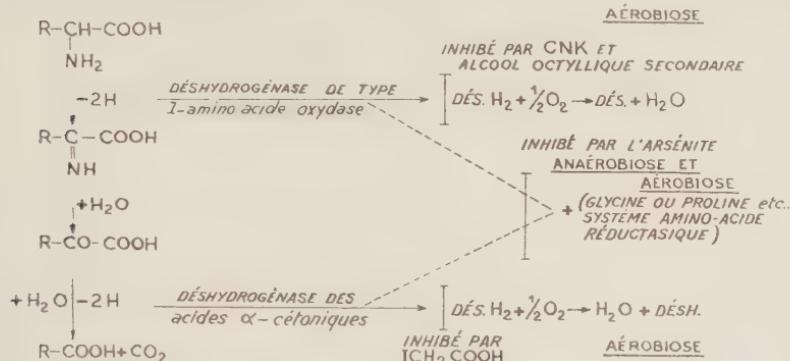
Le système enzymatique qui effectue la réduction de la glycine et de la proline est une hydrogénase. Ces enzymes, découverts par Stephenson et Stickland [6, 18], catalysent les réactions suivantes :



L'accepteur de H_2 peut être : le bleu de méthylène, un nitrate, un sulfate, un thiosulfate, un carbonate, CO_2 , H_2O_2 , CO , un fumarate, etc. Seuls les anaérobies stricts peuvent utiliser certains amino-acides comme accepteurs d' H_2 . D'après Farkas et Fischer [17], qui ont étudié la réduction du fumarate par l'hydrogène moléculaire en présence de suspensions de *Proteus vulgaris*, on peut admettre que les réactions 1 et 2 sont catalysées par des enzymes différents. Quant à la nature de ces enzymes, Yama-

gata [19] a montré que la nitratase de *Pseudomonas aeruginosa* est une flavo-protéine.

Le schéma ci-dessous rend compte de cet ensemble de faits, ainsi que du processus global de la désamination couplée (réaction de Stickland).



Comme on le voit, ce schéma suppose l'existence de trois enzymes distincts :

Une déshydrogénase du type *l*-amino-acide oxydase.

Un système enzymatique amino-acide réductasique.

Et une déshydrogénase des acides α -cétoniques.

Nous n'entendons nullement présenter cette interprétation comme définitive. Elle tend simplement à expliquer avec le minimum d'hypothèses les faits connus ainsi que ceux que nous avons pu mettre en lumière. Nous pensons cependant que ce schéma pourra constituer une aide utile pour une analyse plus approfondie de cette réaction si caractéristique du métabolisme des bactéries anaérobies strictes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] STICKLAND (L. H.). *Biochem. J.*, 1934, **28**, 1746 ; *ibid.*, 1935, **29**, 288, 889.
- [2] NISMAN (B.) et VINET (G.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 277.
- [3] ROSENBERG (A. J.) et NISMAN (B.). *Biophys. et Biochim. Acta*, 1949, **3**, 348.
- [4] NISMAN (B.) et VINET (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **229**, 675.
- [5] NISMAN (B.). Résultats non publiés.
- [6] STEPHENSON (M.) et STICKLAND (L. H.). *Biochem. J.*, 1931, **25**, 205.
- [7] RAYNAUD (M.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, **30**, 713.
- [8] CLIFT (F. B.) et COOK (R. P.). *Biochem. J.*, 1932, **26**, 1788.
- [9] BLANCHARD (M.), GREEN (D. E.), NOCITO (V.) et RATNER (S.). *J. Biol. Chem.*, 1944, **155**, 421.

- [40] LIPMANN (F.) et TUTTLE (L. C.). *J. Biol. Chem.*, 1945, **159**, 21.
- [41] KOCHOLATY (W.) et HOOGERHEIDE (J. C.). *Biochem. J.*, 1938, **32**, 437.
- [42] LIPMANN (F.). *Cold Spring Harbor, Symposia Quant. Biol.*, 1939, **7**, 248.
- [43] NISMAN (B.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **229**, 633.
- [44] LIPMANN (F.). *Adv. in Enzymology*, 1946, **6**, 231.
- [45] HOOGERHEIDE (J. C.) et KOCHOLATY (W.). *Biochem. J.*, 1938, **32**, 949.
- [46] BARKER (A. H.). Communication personnelle.
- [47] FARKAS (L.) et FISCHER (E.). *J. Biol. Chem.*, 1947, **167**, 787.
- [48] STEPHENSON (M.). *Ant. Leeuwenhoek*, 1947, **12**, 33.
- [49] YAMAGATA (S.). *Acta Phytochim.*, 1939, **11**, 145.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 3 Novembre 1949.

Présidence de M. MAGROU.

COMMUNICATIONS

RECHERCHES SUR L'HEMOLYSINE DE *CL. SORDELLII*

par A.-R. PREVOT et J. MALGRAS.

Malgré le haut pouvoir toxinogène de *Cl. sordellii* et l'aspect nettement hémorragique des lésions qu'il provoque chez l'animal d'expérience, il était classique de considérer cet anaérobie comme ne produisant pas d'hémolysine *in vitro*. Toutefois, Mac Farlane en 1948 (1), dans son troisième mémoire sur la biochimie des toxines bactériennes, signale, dans un chapitre très court, que les filtrats de certaines souches de *Cl. sordellii* contiennent une lécithinase qui n'a pas pu être caractérisée complètement à cause de la compétition existant entre elle et une protéase qui trouble aussi le jaune d'œuf. Cette lécithinase n'est neutralisée par une anti-lécithinase que dans la proportion de 50 p. 100, ou même pas du tout.

Notre récent travail sur l'hémolysine de *Cl. bifermentans* (2) nous a conduits à rechercher le pouvoir hémolytique éventuel de *Cl. sordellii*, puisque ces deux espèces sont extrêmement voisines.

L'absence totale d'hémolysine dans les cultures en bouillon VF glucosé après vingt-quatre heures ou plus à 37° C nous a donné l'explication du fait que les premiers auteurs n'ont pas trouvé de pouvoir hémolytique chez ce microbe. Mais nous rappelant que certaines toxines anaérobies n'apparaissent qu'à 33° C en milieu VF (3), nous avons choisi cette température pour de nouveaux essais. Dans une première expérience nous avons obtenu à 33° C en dix-huit heures une hémolysine active à la dose de 0,025 cm³ sur 0,5 cm³ de globules rouges de mouton dilués au 1/20. Cette hémolysine est entièrement neutralisée

(1) MAC FARLANE, *Biochem. J.*, 1948, **42**, 590.

(2) PRÉVOT et CAPONI, ces *Annales*, 1949, **77**, 772.

(3) PRÉVOT, *C. R. Acad. Sci.*, 1939, **208**, 394.

par le sérum anti-*sordellii* [préparé par M. Raynaud, en prenant comme antigène la toxine extraite des corps microbiens par sa méthode au mélange citrate-chlorure (4)], et cela dans les proportions suivantes : 40 doses hémolytiques sont neutralisées par 1/200 de cm³ de sérum, après une demi-heure de contact à 33°. Cette hémolysine, après soixante heures à la glacière, est fortement diminuée et, après cent cinq heures, disparaît ; toutes tentatives de traitement par les réducteurs ne la restaurent pas.

Il s'agit donc d'une hémolysine d'apparition précoce et se détruisant rapidement. Le temps optimum de son apparition a été recherché. Après douze heures d'incubation, la dose hémolytique est déjà de 0,05 cm³ ; après dix-huit heures, elle augmente encore un peu et arrive à atteindre le taux de 0,001 cm³ en vingt heures. Si on traite 10 DHm par l'eau oxygénée, on ne constate aucune destruction. Elle est donc oxygène-stable. La chaleur la détruit rapidement : une demi-heure à 56° C n'en laisse plus aucune trace ; elle est donc thermolabile, et un deuxième chauffage à 100° ne la restaure pas. Les acides et les bases diluées sont sans action sur elle.

La réaction de Nagler avec le sérum humain frais est nettement positive : avec 5 DHm, on obtient un trouble très net suivi de flocculation ; avec 1 DHm, on obtient une légère opalescence. Cette réaction est inhibée par les sérum anti-*sordellii* et anti-*perfringens* ; le premier agit à la dose de 1/1.000 de cm³, le second au 1/5.000 de cm³. Il s'agit donc bien d'une lécithinase, immunologiquement parente avec la lécithinase α de *W. perfringens* et, par conséquent, parente aussi avec la lécithinase de *Cl. bifermentans*.

Cette lécithinase agit de la même façon sur la lécithovitelline (jaune d'œuf de poule). *In vivo*, son action dermo-nécrotique est difficile à rechercher sur la souris, car cet animal est très sensible à la toxine létale et meurt avec des doses infimes avant l'apparition de la nécrose ; mais sur le cobaye, moins sensible, on obtient une nécrose dermique très nette avec 0,2 cm³.

Les globules de lapin sont très sensibles à l'hémolysine *sordellii*, de même que ceux de cheval, de singe et d'homme. Les globules de canard, au contraire, sont peu sensibles. Le calcium n'a aucune action favorisante sur le pouvoir hémolytique, ni sur le pouvoir lécithinasique.

La précipitation de la toxine *sordellii* par le sulfate d'ammonium entraîne la lécithinase hémolytique dans le précipité. On peut ainsi conserver intacte son activité à la glacière ; le titrage de son pouvoir hémolytique donne comme DHm : 0,8 mg. La même dose provoque une réaction de Nagler fortement positive sur le sérum humain et sur le jaune d'œuf dilué.

Devant ces résultats, il était intéressant de répéter les mêmes recherches sur *Cl. valerianicum* et *Cl. caproicum*, que l'un de nous (5) a classé à côté de *Cl. bifermentans* et de *Cl. sordellii*. Nous avons étudié 11 souches du premier et 15 souches du second. Sur les 11 souches de *Cl. valerianicum*, 7 présentaient une lécithinase hémolytique du même type

(4) M. RAYNAUD, VIII^e Congrès Chim. Biol., oct. 1948.

(5) A.-R. PRÉVOT, Manuel de Classification des Anaérobies, 2^e édit., 1948, p. 180.

que celle de *Cl. sordellii* (précoce, oxygène-stable, thermolabile non régénérée à 100°, inhibée par les anti-lécithinases *perfringens* et *sordellii*) et 4 n'avaient aucun pouvoir hémolytique ni lécithinasique. Sur les 15 souches de *Cl. caproicum*, 11 présentaient la lécithinase hémolytique du groupe et 4 ne la présentaient pas. Quelques petites différences se sont montrées dans leur comportement : certaines étaient favorisées par le calcium et d'autres indifférentes ou même inhibées ; l'une était détruite par H_2O_2 et non régénérée par l'hydrosulfite ; aucune n'était dermo-nécrosante. Ainsi, dans l'ensemble, *Cl. valerianicum* et *Cl. caproicum* se présentent comme étant beaucoup plus près de *Cl. bifementans* que de *Cl. sordellii*.

Conclusions. — *Cl. sordellii* possède une lécithinase hémolytique apparaissant précocement dans les cultures à 33° en bouillon VF glucosé, se détruisant rapidement à l'état liquide, mais facile à conserver intacte à l'état sec après précipitation. Oxygène-stable, thermolabile, non influencée par Ca^{++} , elle donne la réaction de Nagler et est neutralisée par les antilécithinases anti-*perfringens* et anti-*sordellii*. Elle agit sur les globules de mouton, de lapin, de cheval, de singe et d'homme ; elle est dermo-nécrosante en injection intradermique au cobaye. On retrouve une lécithinase hémolytique très semblable chez 7 souches sur 11 de *Cl. valerianicum* et chez 11 souches sur 15 de *Cl. caproicum*, mais ces dernières ne sont pas dermo-nécrosantes, ce qui rapproche plus ces deux espèces de *Cl. bifementans* que de *Cl. sordellii*.

(*Institut Pasteur. Service des Anaérobies.*)

**COMPARAISON ENTRE L'EXTRACTION
DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC
PAR VOIE MÉCANIQUE
ET SOUS L'ACTION DES ENZYMES
DU TUBE DIGESTIF DE L'ESCARGOT**

P. LIMASSET, P. CORNUET et Y. GENDRON.

On extrait généralement les virus des plantes en soumettant les tissus à un broyage relativement grossier, la pulpe et les fibres résistantes étant ensuite pressées dans une étamine. Bawden et Pirie (1) ont montré que les jus obtenus contenaient seulement une partie du virus existant dans les tissus. De nouvelles fractions très importantes pouvaient être libérées en soumettant le résidu à un broyage plus poussé et à l'action d'une solution de trypsine ou d'un extrait du tube digestif de l'Escargot. Dans le cas du virus de la mosaïque du Tabac, la digestion par la trypsine permettait une extraction plus abondante de virus lorsqu'elle intervenait avant le broyage par rapport aux quantités libérées en inversant l'ordre des opérations. L'incubation en présence d'extraits du tube digestif de l'Escargot, source

(1) F. C. BAWDEN et N. W. PIRIE. *Brit. J. exp. Path.*, 1946, 27, 81.

connue de cellulase, permettait d'extraire une quantité de virus plus importante encore. D'après Pirie (2), « la nature de la liaison détruite n'a été déterminée en aucun cas. Il n'est même pas établi qu'une protéase, plutôt que quelque autre constituant des mélanges enzymatiques, ne serait pas responsable de cette libération (du virus) ». Nous sommes allés plus loin que Pirie en nous demandant si les enzymes agissent bien en détruisant une liaison, de nature inconnue, attachant le virus au résidu solide provenant du broyage ou si les particules du virus ne resteraient pas tout simplement emprisonnées à l'intérieur de certaines cellules épargnées par le broyage. Dans cette hypothèse, les enzymes de l'Escargot agiraient essentiellement par leurs cellulases en complétant la désintégration des tissus. S'il en est bien ainsi, un broyage extrêmement poussé doit produire le même effet et permettre l'extraction de la totalité du virus sans recourir à l'action d'enzymes.

Les résultats relatés dans cette note, précisant ceux que nous avons publiés ailleurs (3), semblent apporter des arguments solides en faveur de la validité de cette conception.

Des feuilles de Tabacs infectés étaient divisées en deux longitudinalement, les parties droite et gauche étant réparties en deux lots distincts de même poids et physiologiquement comparables, dont l'un était broyé avec l'appareil à hélice et l'autre au mortier. Le premier lot subissait cinq broyages successifs au broyeur à hélice à 12.000 tours pendant une minute et demie, les fibres et culots de centrifugation étant lavés à l'eau. On faisait agir ensuite sur ces derniers, après épuisement, les enzymes de l'Escargot (quarante-huit heures au pH 7,3). Le premier jus et les caux de lavage contenaient 31.810 unités sérologiques (4), correspondant à 20,85 g. de feuilles. Les enzymes ne libéraient ensuite que 404 U. S. La quantité de virus extraite mécaniquement atteignait donc 98,7 p. 100. Le lot broyé au mortier avait dû subir sept broyages suivis de lavages de la fibre et des culots pour obtenir l'épuisement. La quantité ainsi extraite mécaniquement atteignait 10.570 U. S., l'action ultérieure des enzymes fournissant 21.760 U. S. supplémentaires. La quantité totale du virus extrait était la même que celle de l'autre lot, aux erreurs d'expérience près (32.330 U. S. contre 32.214 U. S.), mais l'extraction mécanique ne touchait plus que 32,8 p. 100 du virus, le reste ne pouvant être libéré que par les enzymes. Un deuxième essai fut réalisé suivant la même technique, en soumettant un lot de demi-feuilles à un broyage à 8.000 tours seulement, le lot témoin étant broyé au mortier comme dans l'expérience précédente. La quantité de virus extraite mécaniquement du lot broyé à 8.000 tours atteignait 14.630 unités sérologiques, pour 19,45 g. de tissu foliaire. Les enzymes libéraient ensuite 8.180 U. S. La quantité totale extraite mécaniquement n'était que de 64,6 p. 100.

(2) N. W. PIRIE. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol.*, 1946, **11**, 184.

(3) P. LIMASSET, P. CORNUET et Y. GENDRON, *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 888.

(4) Unité arbitraire correspondant à la quantité de virus contenue dans 1 cm³ de jus dont la concentration correspond à la dilution limite avec le sérum utilisé. Les comparaisons ne sont valables que si tous les dosages sont effectués avec un même sérum.

Le témoin fournissait à l'extraction mécanique 8.750 U. S., soit 41 p. 100 du total, et 12.500 U. S. avec les enzymes. On voit donc que le broyage à 8.000 tours, beaucoup plus grossier que le broyage à 12.000 tours, permet une extraction mécanique plus faible, l'action des enzymes cessant alors d'être négligeable. La comparaison de l'effet du broyage au mortier et au broyeur à hélice à 8.000 tours et 12.000 tours permet de constater que l'action des enzymes décroît quand la finesse du broyage augmente. Il semble donc bien que celles-ci, qui sont constituées en majeure partie par des cellulases, agissent uniquement en complétant la dislocation des éléments cellulaires et en dissolvant les membranes dans les fragments de tissus soumis à leur action. Les résultats de Bawden et Pirie, qui obtenaient la libération d'un surplus de virus très important sous l'action des enzymes, s'expliquent par le fait que ces auteurs employaient un broyeur à rouleau opérant par écrasement et dont l'action était probablement assez comparable à celle du mortier. L'appareil à hélice tranche au contraire les tissus et les débite en fragments contenant très peu de cellules.

Les résultats peuvent se résumer comme suit :

	QUANTITÉS EXTRAITES		
	par broyage	par les enzymes	Total
Lot 1 à 12.000 tours	30.510 U.S., soit 97,7 p. 100.	387 U.S., soit 1,3 p. 100,	30.897 U.S.
Lot 1 au mortier.	10.130 U.S., soit 32,8 p. 100.	20.870 U.S., soit 67,2 p. 100.	31.000 U.S.
Lot 2 à 8.000 tours.	15.040 U.S., soit 64,6 p. 100.	8.410 U.S., soit 35,4 p. 100.	23.450 U.S.
Lot 2 au mortier.	8.990 U.S., soit 41 p. 100.	12.850 U.S., soit 59 p. 100.	21.840 U.S.

Les quantités indiquées dans ce tableau ont été ramenées à 20 g. de feuilles.

A l'examen de ces chiffres, nous constatons, d'une part, que l'action des enzymes tend à devenir négligeable quand on atteint une grande finesse de broyage et, d'autre part, que la quantité totale de virus extraite d'échantillons de même poids et physiologiquement comparables est approximativement la même, quelle que soit la finesse du broyage dès l'instant où ce dernier est suivi d'une macération en présence des enzymes de l'Escargot.

Les résultats obtenus, outre qu'ils nous conduisent à penser que le virus de la mosaïque du tabac n'est pas libéré par le complexe enzymatique étudié, en raison de la rupture d'une liaison chimique avec le substrat (liaison préexistante *in vivo* ou consécutive à l'extraction), ont aussi l'intérêt de nous fournir une méthode d'extraction purement mécanique, très aisée à mettre en œuvre et aussi efficace que les moyens compliqués récemment préconisés.

Nous n'aborderons pas ici l'action de la trypsine. Celle-ci est de nature tout à fait différente, et nous l'avons d'ailleurs envisagée dans une publication déjà citée.

(*Institut National de la Recherche Agronomique.*)

**EFFET SUR L'ACCROISSEMENT
D'UNE TUMEUR EXPÉRIMENTALE DU RAT BLANC
(SOUCHE T8 DE GUÉRIN)
DE L'ADMINISTRATION PAR VOIE BUCCALE
D'UN COMPLEXE FERRICO-SODIQUE
DE L'ACIDE TARTRIQUE**

par A. MOREL, A. JOSSERAND, J. VIALLIER et J. C. KALB

Ces expériences ont été faites depuis deux ans sur 140 rats blancs répartis en 7 séries, chacune de ces séries comportant 10 rats traités et 10 rats témoins.

Chaque rat traité recevait, matin et soir, dès le lendemain de la greffe, mélangé avec un peu de lait, 1 centigramme du complexe ferritartrosodique jaune non colloïdal, avec adjonction de carbonate de chaux en excès, destiné à neutraliser toute l'acidité gastrique et empêcher ainsi la démolition du complexe et la transformation partielle du fer ferrique en fer ferreux. Les animaux témoins recevaient la même quantité de carbonate de chaux.

Les rats étaient sacrifiés entre le vingtième et le vingt-quatrième jour après la greffe, et l'on comparait le poids des tumeurs de la série traitée à celui de la série témoin.

Les trois premières séries ont donné des résultats assez peu homogènes qui tiennent, selon nous, aux précautions insuffisantes pour avoir des séries de greffes rigoureusement comparables, tant en ce qui concerne le volume des greffons que surtout le temps écoulé entre le prélèvement de la tumeur et le moment où s'était opérée, au cours d'une séance d'inoculation, l'insertion des fragments tumoraux. Voici tout d'abord les résultats de ces 3 premières expériences :

POURCENTAGE des tumeurs développées	POIDS MOYEN des tumeurs	
<i>Expérience n° 1 :</i>		
Témoins : 4/10	6,7	g.
Traités : 2/10	5	g.
<i>Expérience n° 2 :</i>		
Témoins : 9/10	16,7	g.
Traités : 10/10	12	g.
<i>Expérience n° 3 :</i>		
Témoins : 10/10	14	g.
Traités : 10/10	15,6	g.

Au cours des 4 expériences suivantes, la technique a bénéficié des 3 précédentes et les greffes ont été faites avec des greffons de même volume et prélevées sur la tumeur au même moment pour être insérées sur un couple témoin traité.

Ces 4 expériences, que nous noterons par les chiffres 4, 5, 6, 7, se sont opérées dans des conditions satisfaisantes, sauf pour la série 6, où les animaux des 2 séries, témoins et traités, présentèrent de nombreux abcès d'origine indéterminée en différents points de l'organisme.

POURCENTAGE des tumeurs développées	POIDS MOYEN des tumeurs
<i>Expérience n° 4 :</i>	
Témoins : 10/10	3,7 g.
Traités : 10/10	2,4 g.
<i>Expérience n° 5 :</i>	
Témoins : 10/10	6,1 g.
Traités : 9/10	3,4 g.
<i>Expérience n° 6 (infection intercurrente avec suppurations) :</i>	
Témoins : 10/10	2,1 g.
Traités : 10/10	1,9 g.
<i>Expérience n° 7 :</i>	
Témoins : 10/10	3,4 g.
Traités : 8/10	2,8 g.

Dans l'ensemble, le ralentissement de l'accroissement tumoral est de l'ordre de 30 p. 100. Il ne s'agit, selon nous, que d'une diminution de la rapidité d'accroissement sous l'influence d'une désinfiltration par le complexe ferri-tartrosodique.

Nous nous basons sur le fait que les métastases ganglionnaires nous sont apparues, dans l'ensemble, moins fréquentes chez les animaux traités que chez les témoins ; d'autre part, dans plusieurs séries d'expériences, nous avons noté que la zone rouge du point de greffe pâlissait plus rapidement chez les traités que chez les témoins, au cours de la première semaine après la greffe.

Il ne doit pas s'agir d'une action sur la cellule néoplasique elle-même, car les examens histologiques n'ont pas montré de différences entre les tumeurs traitées et les tumeurs témoins.

Ces constatations cadrent bien avec les effets obtenus par injection intraveineuse de ce complexe, sur des animaux spontanément cancéreux, à l'Ecole vétérinaire de Lyon.

*(Laboratoire de Pathologie générale et expérimentale.
Faculté de Médecine de Lyon.)*

RECHERCHES SUR LE MODE D'ACTIVITÉ DES SULFONES

II. — ÉTUDE ANALYTIQUE

par F. BOYER, M^{me} J. TROESTLER, N. RIST et TABONE

Dans une étude récente, Boyer, Rist et M^{me} Saviard (1) ont montré que l'activité bactériostatique *in vitro* des amino-diphénylsulfones mono et di-substituées augmente sous l'influence du vieillissement à l'étuve ou de l'autoclavage. Ils admettent que ce phénomène est dû à la libération de diaminodiphénylsulfone (D. D. S. ou sulfone mère), mais n'ont pu en apporter la preuve chimique.

La présence de sulfone mère dans un liquide contenant une sulfone combinée ne peut être démontrée par la technique de Marshall. Celle-ci est pratiquée en milieu acide et, de ce fait, les sulfones combinées, peu stables, risquent d'être hydrolysées, au moins partiellement.

Nous avons pensé que la chromatographie de partage proposée par Consden et ses collaborateurs (2) pour l'analyse des acides aminés, et que l'un de nous a mise au point pour l'analyse des arylamines biologiques (3 et 4), conviendrait pour l'étude de ce problème. Cette méthode respecte, en effet, l'intégrité des molécules des sulfones substituées.

Dans le présent travail, nous recherchons tout d'abord si les sulfones mises à la disposition des médecins et des bactériologistes ne contiennent pas de sulfone mère libre, comme leur labilité et leur mode de préparation permettent de le supposer. Nous examinerons en même temps si l'autoclavage augmente la teneur de ces produits en sulfone mère libre, comme l'admettent Boyer, Rist et Saviard, d'après l'augmentation du pouvoir bactériostatique. Enfin, nous aborderons l'étude du sort des sulfones dans l'organisme.

TECHNIQUE EMPLOYÉE. — Nous nous sommes servis de l'appareil décrit par Consden. Le papier utilisé est le papier Watman n° 4. Le solvant qui nous a donné les meilleurs résultats est l'alcool butylique saturé d'eau. La position des substances a été révélée, après chromatographie, par vaporisation du réactif d'Ehrlich (solution alcoolique de di-méthyl-para-amino-benzaldéhyde additionnée de HCl). Une goutte de la solution à étudier (0,001 cm³) a été déposée au moyen de pipettes effilées préalablement calibrées.

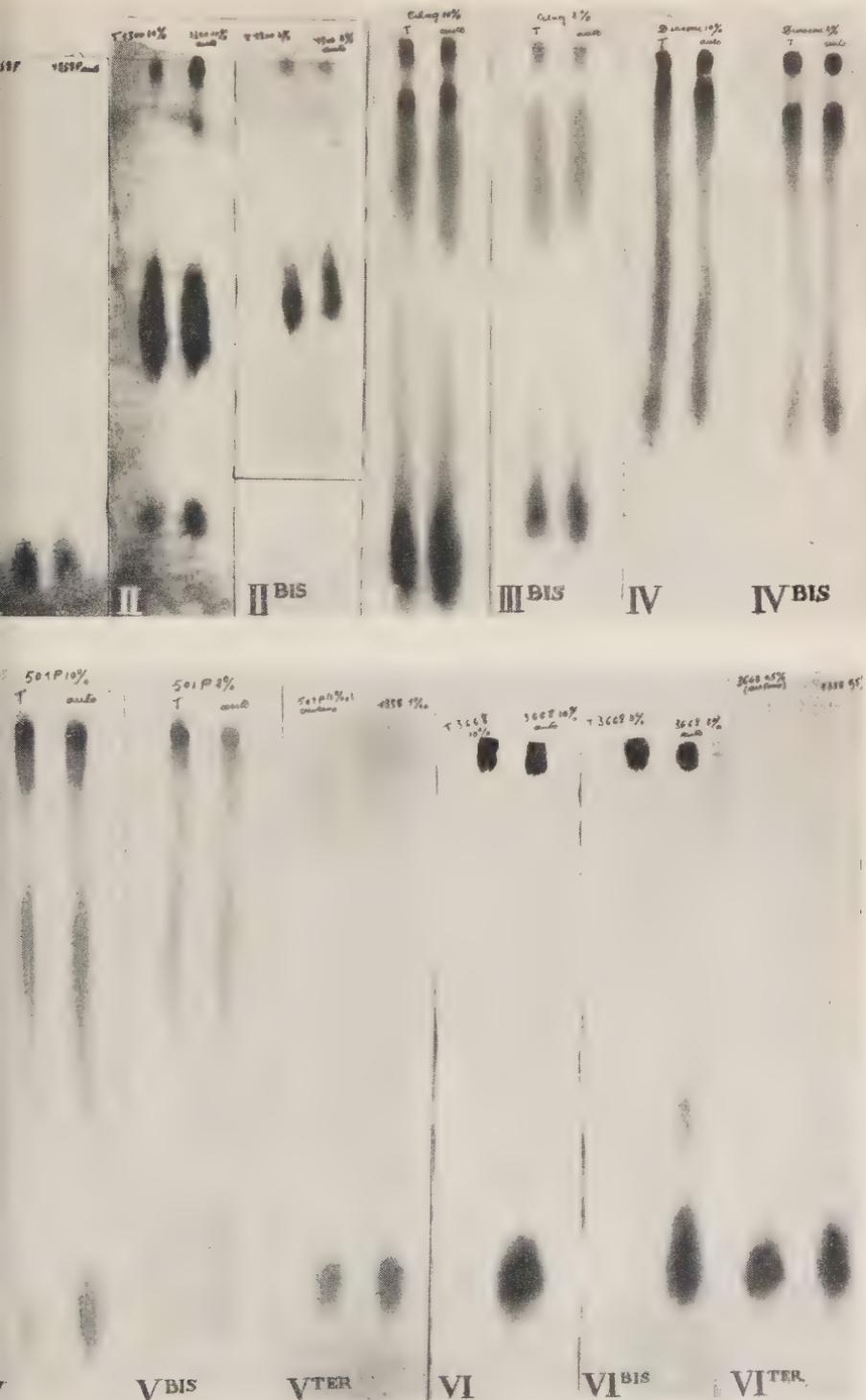
Toutes les sulfones étudiées dans ce travail ont été employées en solutions aqueuses à 10 p. 100 et 2 p. 100 avant et après autoclavage

(1) *Ces Annales*, 1949, **77**, 680.

(2) CONSDEN, GORDON et MARTIN, *Biochem. J.*, 1944, **38**, 224.

(3) J. TABONE, D. ROBERT et J. TROESTLER, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1948, **30**, 547.

(4) J. TABONE et D. ROBERT, *Ces Annales*, 1948, **74**, 146.



de une heure à 120°, en tubes scellés. Seule, la diamino-diphényl sulfone, peu soluble dans l'eau, a été utilisée en solution à 1 p. 10.000, c'est-à-dire à saturation à 20°. Sur chaque chromatogramme, nous avons déposé une goutte de solution non autoclavée, qui nous a servi de témoin et, à côté d'elle, une goutte de la même solution autoclavée.

RÉSULTATS. — 1° 4-4' *para-diamino-diphényl-sulfone* (1358 F) ou *sulfone mère*). — Elle donne, après chromatographie et pulvérisation du réactif d'Ehrlich, une tache jaune unique dont le Rf est de 0,80. Cette tache est encore visible quand on dépose sur le papier 0,1 γ de produit. La même solution soumise à l'autoclavage donne un chromatogramme identique à la solution témoin (photo I).

2° 4 *amino* 4' *succinylamino-diphényl-sulfone* [1500 F] (5). — Les chromatogrammes obtenus avec cette sulfone se caractérisent par la présence de 3 taches jaunes distinctes de surface et d'intensité très différentes. La tache inférieure, très pâle, a un Rf identique à celui de la sulfone mère.

Àvec les solutions autoclavées, on observe une augmentation sensible de l'intensité de coloration de la tache inférieure, les deux autres taches gardant le même aspect (photos II et II bis).

3° 4 *amino* 4' *carboxyméthyl-amino-diphényl-sulfone* [phényl-glycine sulfone] (6). — Nous observons 3 taches distinctes. Le Rf de la tache inférieure est le même que celui donné par le 1358 F, mais sa surface et son intensité sont beaucoup plus grandes que celles que nous donne la sulfone mère en solution saturée aqueuse.

L'autoclavage des solutions n'augmente que très légèrement l'importance de la tache inférieure (photos III et III bis).

4° 4-4' *diamino-diphényl N-N' di-formaldéhyde sulfonate de soude* [Diasone] (7). — On note la présence de 3 taches qu'on distingue plus facilement sur le chromatogramme de la solution à 2 p. 100. La tache inférieure est représentée par une traînée particulièrement importante.

L'autoclavage augmente légèrement l'importance de la tache inférieure (photos IV et IV bis).

5° 4-4' *diamino-diphényl-sulfone N-N' diglucose-sulfonate de soude* [501 F ou Promine] (8). — Trois taches sont observées sur le chromatogramme. La tache inférieure occupe la même position que celle donnée par la sulfone mère.

Après autoclavage et refroidissement, on obtient un précipité. Le filtrat soumis à la chromatographie présente un aspect identique à celui de la solution témoin, la tache inférieure étant cependant beaucoup plus importante.

La chromatographie du précipité, mis en solution alcoolique à 1/1.000, donne une tache unique dont le Rf et l'importance sont identiques

(5) Nous avons préparé le sel de soude du 1500 F à partir du produit confié par la maison Theraplix.

(6) Nous avons employé, soit le sel de soude présenté en ampoules par la maison Cilag, soit le sel de soude préparé par nous-mêmes à partir de la substance acide en poudre confiée par la même maison.

(7) Confié par la maison Abbott et C°.

(8) Fournie par la maison Siegfried.

à celle que donne la sulfone mère dans les mêmes conditions (photos V, V bis et V ter).

6° 4,4' (γ -phényl-propylamino) diphénylsulfone α : γ : α' γ' tetrasulfonate de sodium [3668 RP ou Cimedone] (9). — Le chromatogramme révèle 2 taches, l'une au lieu du dépôt de la substance, l'autre, très pâle, au niveau de la sulfone mère.

Après autoclavage et refroidissement, on observe un dépôt cristallin.

Le filtrat chromatographié montre les deux mêmes taches que la solution témoin ; la tache inférieure est toutefois beaucoup plus importante que pour la solution non autoclavée.

Les cristaux recueillis ont été dissous dans l'alcool (solution à 0,5 p. 100). Ils donnent alors une tache unique, identique à celle d'une solution alcoolique de sulfone mère à la même concentration (photos VI et VI bis).

DISCUSSION DES RÉSULTATS. — La chromatographie s'est révélée comme une méthode parfaitement indiquée pour l'étude analytique des sulfones. D'une part, en effet, elle ne fait appel à aucun réactif susceptible de décomposer ces molécules particulièrement labiles, et, d'autre part, les produits intensément colorés que donne la diméthyl-paroamino-benzaldéhyde avec ce groupe de substances permettent de déceler celles-ci alors même qu'elles existent en quantités extrêmement faibles.

La solution aqueuse saturée de sulfone mère (concentration 1/10.000) donne, après chromatographie, une tache unique et distincte dont le Rf est constant. Ce produit doit donc être considéré comme pur, ou du moins on peut affirmer qu'il ne contient aucune substance donnant avec le réactif d'Ehrlich une réaction colorée et, en particulier, aucune arylamine. Par contre, pour les produits de substitution du 1358 F, aussi bien les mono- que les di-substitués, que nous avons étudiés et qui sont mis à la disposition des médecins, sont en réalité des mélanges plus ou moins complexes, dans lesquels il nous a toujours été possible de déceler la présence, en quantités variables, de sulfone mère.

Le composé qui en renferme le plus est la phényl-glycine-sulfone (n° 3). Dans les expériences de bactériologie de Boyer et ses collaborateurs, c'est aussi cette substance qui s'est montrée la plus active *in vitro*. On peut donc supposer que cette supériorité apparente est due, non aux particularités du groupement de substitution, mais à la sulfone mère libre que le produit contient.

Sur les chromatogrammes de la diasone, il est impossible d'affirmer la présence de sulfone mère, car la tache inférieure est ici remplacée par une longue traînée qui représente un produit de décomposition non identifié, dont la présence masque peut-être une tache due à la sulfone mère.

Quant à la tache intermédiaire, qui apparaît sur les chromatogrammes de plusieurs sulfones, nous ignorons actuellement sa signification. Nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse selon laquelle les deux taches supérieures seraient dues, l'une au dérivé sodé l'autre au produit acide.

Sur les chromatogrammes des solutions autoclavées la tache de sul-

(9) Cimedone ou 3668 RP confié par la maison Rhône-Poulenc.

ione mère augmente. C'est donc bien l'augmentation de la teneur en sulfone mère qui explique l'augmentation du pouvoir bactériostatique observé après autoclavage par Boyer, Rist et Saviard.

CHROMATOGRAPHIE DES URINES DE LAPINS TRAITÉS PAR LES SULFONES. — Les résultats relatés ci-dessus nous autorisent à étudier, par la même méthode, le sort des amino-diphényl-sulfones dans l'organisme. Nous avons donc examiné, en parallèle, le chromatogramme de l'urine de lapin avant et après administration de sulfone.

De ces études, qui sont en cours, nous donnerons seulement deux résultats. Sur les chromatogrammes des urines de lapin traité par la sulfone mère (50 mg./kg. par voie sous-cutanée) apparaissent en plus des taches que l'on trouve avec les urines normales, deux taches nouvelles ; l'une, inférieure, qui a la position de la tache de sulfone mère, l'autre, supérieure, d'un jaune orangé particulièrement intense, se trouve au lieu même de dépôt de la goutte d'urine.

Si les lapins ont reçu, *per os*, 180 mg./kg. de 3668 RP, le chromatogramme révèle également deux taches nouvelles dont l'une a la même position que la sulfone mère.

Utilisant soit la méthode d'extraction, soit la chromatographie directe, M. I. Smith et ses collaborateurs (10) ont mis en évidence la D. D. S. contenue dans l'urine de lapin ayant ingéré cette sulfone. Ils en concluent que la D. D. S. est éliminée en grande partie sous forme inchangée, et pensent que ces méthodes permettent de savoir rapidement si une sulfone donnée libère *in vivo* la sulfone mère.

CONCLUSION.

L'étude chromatographique de la sulfone mère et de ses dérivés de substitution montre que ces dérivés contiennent tous en proportion variable de faibles quantités de sulfone mère. La méthode permet d'étudier les transformations que subissent les sulfones, soit sous l'influence d'actions physiques telles que l'autoclavage, soit dans l'organisme de l'animal.

(10) M. I. SMITH, E. L. JACKSON, Y. T. CHANG et W. H. LONGENECKER, *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **71**, 23.

ANTIBIOTIQUES ET LYSE BACTÉRIOPHAGIQUE

IV. — ÉTUDE, AU MICROBIOPHOTOMÈTRE,
DE L'ACTION CONJUGUÉE DU BACTÉRIOPHAGE
ET DE LA STREPTOMYCINE
SUR LA CULTURE D'UN STAPHYLOCOQUE BLANC

par EWALD EDLINGER et MICHEL FAGUET.

Dans une communication antérieure (1), nous avons déjà montré que la streptomycine, ajoutée en même temps que le bactériophage Twort à une culture du staphylocoque blanc Twort, n'empêche pas la lyse, mais la retarde considérablement. Cette lyse ne se produit que lorsque la culture, arrêtée dans son développement par l'action bactériostatique, reprend sa marche ascendante par suite du développement des germes streptomycinorésistants.

Dans le présent travail, nous avons utilisé le bactériophage staphylococcique N qui laisse régulièrement apparaître, après un délai assez bref, des cultures secondaires contrairement au phage Twort dont la lyse est généralement définitive. Outre la question du comportement de ces cultures secondaires vis-à-vis de la streptomycine, nous avons désiré suivre la succession des phénomènes qui se produisent lorsque le phage et la streptomycine sont ajoutés non plus ensemble, mais l'un après l'autre, à des intervalles de temps variés.

Comme dans le travail mentionné ci-dessus, nous avons réuni ici en deux figures les résultats les plus caractéristiques obtenus à l'aide du microbiophotomètre de M. Faguet (2).

Les courbes de la première figure montrent une croissance normale chez la culture-témoin, une diminution de la densité optique relativement lente, suivie de l'apparition d'une culture secondaire dans la cuve qui n'a reçu que la streptomycine. Dans ce dernier cas, on constate, après un temps relativement long, l'apparition de la culture streptomycinorésistante. Dans les autres cuves la streptomycine, ajoutée pendant la phase exponentielle de la culture, arrête toujours le développement de celle-ci. Le phage, ajouté soit en même temps que la streptomycine, soit pendant toute la durée de la bactériostase streptomycinique, manifeste son action lytique comme s'il était ajouté seulement au moment de l'apparition de la culture streptomycinorésistante : le retard dans l'apparition de la lyse est donc d'autant plus court que l'intervalle écoulé entre l'introduction de la streptomycine et celle du bactériophage a été plus long.

D'autre part, nous avons constaté que les cultures secondaires à la lyse bactériophagique, par conséquent phagorésistantes, sont également streptomycinorésistantes.

(1) M. FAGUET et E. EDLINGER, ces *Annales*, 1949, **77**, 204.

(2) M. FAGUET, *Act. Scient. et Ind.*, Hermann, édit., Paris, 1941, 102 : *J. suisse Méd.*, 1946, **44**, 1155.

Dans la deuxième figure sont réunies les courbes de la croissance bactérienne, dans lesquelles le phage était ajouté en premier lieu à la culture. Si on ajoute la streptomycine avant que la lyse ne commence, on constate que celle-ci s'effectue avec un retard semblable à celui que nous avions observé lorsque la streptomycine était ajoutée en même temps que le phage.

Au contraire, si la streptomycine est ajoutée à la culture pendant la lyse, celle-ci est sensiblement accélérée. Il semble ici s'agir d'une synergie de la streptomycine et du phage analogue à celle qui a été

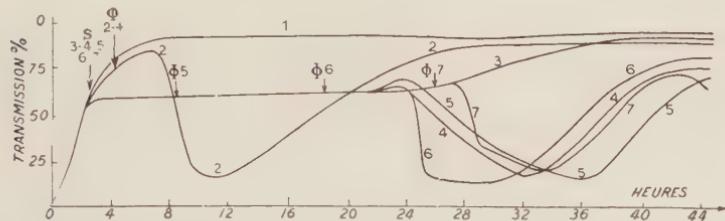


FIG. 1. — 1, courbe témoin; 2, phage seul; 3, 20 γ streptomycine seule; 4-7 phage et streptomycine; \downarrow = intervention; Φ = 4 gouttes de phage N pur; S = 20 γ streptomycine par centimètre cube.

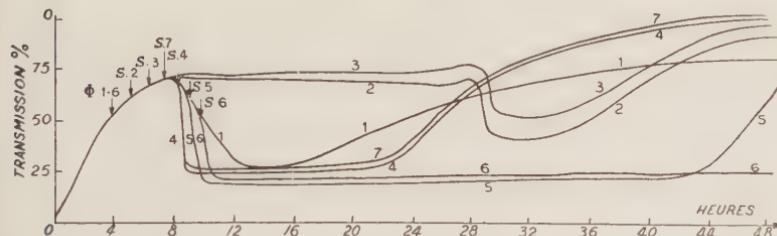


FIG. 2. — 1, phage seul; 2-7, phage + streptomycine; \downarrow = intervention; Φ = 16 gouttes de phage N pur; S = 20 γ streptomycine par centimètre cube.

décrise par Himmelweit (3) et par P. Nicolle et l'un de nous [Faguet] (4) dans le cas de la pénicilline et du bactériophage.

Les cultures secondaires qui se développent beaucoup plus tard que dans une culture soumise au phage seul, sont aussi streptomycino-résistantes. Nous ne pouvons pas, actuellement, donner d'explication de ces phénomènes, mais les faits observés peuvent être résumés de la façon suivante :

Les observations au microbiophotomètre des cultures du staphylocoque blanc Twort soumises à l'action conjuguée de la streptomycine et du bactériophage N montrent que la streptomycine ajoutée avant

(3) F. HIMMELWEIT, *Lancet*, 1945, 2, 104.

(4) P. NICOLLE et M. FAGUET, ces *Annales*, 1947, 73, 490.

ou en même temps que le phage, c'est-à-dire avant la lyse, retarde celle-ci jusqu'à l'apparition des cultures streptomycinorésistantes. A ce moment, elle se produit avec ses caractéristiques habituelles et elle est suivie de l'apparition d'une culture secondaire. Si la streptomycine est ajoutée pendant la lyse phagique, elle accélère celle-ci, donc elle produit un effet synergique. Les cultures secondaires phagorésistantes sont dans les deux cas streptomycinorésistantes.

(Institut Pasteur. Service du Bactériophage et C. N. R. S.).

UN NOUVEAU TYPE ANTIGÉNIQUE DE *SHIGELLA BOYDII*

par S. SZTURM, D. et M. PIÉCHAUD* et R. NÉEL.

Dans le cours de cette année, l'un de nous a isolé, à Madagascar, chez deux malades présentant un syndrome dysentérique complet avec émission de glaires muco-sanglantes, un bacille immobile, ne gardant pas la coloration de Gram et présentant les caractères biochimiques des *Shigella*. Ces deux souches, D 15 et D 21, ont été isolées sur gélose lactosée au bleu de bromothymol en culture presque pure, associées seulement à quelques bacilles du côlon.

Les deux germes sont immobiles à l'examen à l'état frais, en gélose molle à l'étuve ou à la température du laboratoire.

En vingt-quatre heures, leur culture en bouillon est abondante, homogène avec des ondes moirées ; leurs colonies sur gélose sont rondes, régulières, transparentes, de 2 à 4 mm. de diamètre.

Ils ne produisent ni indol, ni H_2S ; n'utilisent ni l'urée, ni le citrate ; ne modifient ni le lait, ni le petit lait tournesolés.

Ils ne fermentent ni lactose, ni saccharose, ni dulcite.

Comme toutes les *Shigella flexneri* ou *boydii* (1) ils utilisent le glucose, la mannite et l'arabinose ; ils fermentent aussi maltose, galactose et glycérine (D 21 en vingt-quatre heures, D 15 en huit jours).

Tous les caractères de ces deux souches sont semblables, cependant D 15 utilise le xylose en six jours, tandis que D 21 ne le fermente pas même en trois semaines.

Pour l'étude sérologique de ces deux souches, que leurs caractères biochimiques classent dans le groupe des paradysentériques, nous avons utilisé des suspensions vivantes, formolées et bouillies. Aucun des sérums de *Shigella flexneri* ou de *Shigella boydii* n'agglutine ces deux souches.

Nous avons aussi recherché les rapports possibles avec les autres *Shigella* et les Salmonelles sans trouver aucun antigène commun.

Nous avons préparé avec la souche D 15 un serum agglutinant en faisant à un lapin quatre injections à cinq jours d'intervalle de 1/2, 1, 1, 1 cm³ d'une émulsion contenant environ 1 milliard de germes par centimètre cube. L'animal fut saigné le huitième jour après la dernière injection.

(1) William H. ERVING, *J. Bact.*, 1949, 57, 633.

Le sérum ainsi préparé agglutinait sa souche homologue D 15 à 1/3.200 et la souche D 21 à 1/6.400. L'absorption du sérum par une culture de D 21 supprime toute agglutination de la souche D 15 par son sérum homologue. Aucune souche de *Shigella* n'est agglutinée par ce sérum même à la dilution de 1/20.

Nous pensons donc qu'il s'agit d'une huitième *Shigella boydii* (1), puisque cette souche, ayant tous les caractères des paradyntériques, ne présente qu'un antigène spécifique de type.

(Service de Microbie de l'Institut Pasteur
et Institut Pasteur de Tananarive.)

LES SALMONELLOSSES DANS LE NORD DE LA FRANCE

par R. BUTTIAUX, L. LE MINOR et A. KESTELOOT (1).

Au cours des années 1947-1948 et des dix premiers mois de 1949, nous avons recherché les *Salmonella* dans 1.242 selles d'individus différents. Il s'agissait d'échantillons provenant de malades atteints de syndromes intestinaux d'allure infectieuse, aigus, subaigus ou chroniques, et habitant les départements du Nord et du Pas-de-Calais. Les recherches ont été effectuées de la façon suivante :

1^o Ensemencement large et simultané des fèces sur milieu au sélé-nite acide de sodium et sur milieu de Muller-Kauffmann ; 2^o après incubation à 37° durant dix-huit à vingt-quatre heures, repiquage des milieux d'enrichissement sur SS. agar (Difco) et gélose au désoxycholate-citrate-lactose de Leifson ; 3^o isolement des colonies suspectes sur milieu de Kligler (lactose + glucose + sulfate ferreux) ; 4^o étude biochimique et antigénique des germes après nouvel isolement sur gélose lactosée au bromo-crésol-pourpre.

Dans ces 1.242 selles, nous avons isolé 247 fois une *Salmonella*, soit dans 19,8 p. 100 des cas. Cette fréquence élevée pouvait être due à l'épidémie de fièvre paratyphoïde B ayant sévi en France dès mars 1949. Si nous séparons les années 1947-1948 durant lesquelles aucune épidémie importante de salmonellose n'a été signalée, de l'année 1949, nous avons les résultats suivants :

Durant les années 1947-1948 :

Nombre de selles examinées	607
Nombre de <i>Salmonella</i> isolées	82
Soit un pourcentage de	13,5 p. 100

Durant les dix premiers mois de 1949 :

Nombre de selles examinées	635
Nombre de <i>Salmonella</i> isolées	165
Soit un pourcentage de	25,9 p. 100

(1) Travail effectué en partie grâce à une allocation de recherches de l'Institut national d'Hygiène.

Il apparaît donc, qu'en dehors de toute épidémie importante, les *Salmonella* jouent cependant un rôle manifeste dans l'étiologie des syndromes intestinaux infectieux, puisqu'on les y trouve dans 13,5 p. 100 des cas.

Les espèces les plus fréquemment identifiées ont été :

S. paratyphi B 1 (23 fois en 1947-1948, 143 fois en 1949, soit 67,4 p. 100).

S. typhi (30 fois en 1947-1948, 12 fois en 1949, soit 17 p. 100).

S. typhi murium (19 fois en 1947-1948, 5 fois en 1949, soit 9,7 p. 100).

Il existe en outre d'autres espèces beaucoup plus rarement rencontrées ; certaines justifient l'énoncé de quelques détails bactériologiques ou épidémiologiques :

S. paratyphi B 2 a été trouvée 3 fois dans une intoxication alimentaire collective très bénigne.

S. essen a été isolée 1 fois dans une selle d'enfant présentant une diarrhée aiguë avec hyperthermie.

S. enteritidis, rencontrée 3 fois, a produit des syndromes gastro-intestinaux d'allure clinique très aiguë et grave. Une des souches a été isolée sous la forme muqueuse.

S. pullorum a été isolée chez trois sujets ayant absorbé des œufs contaminés, cuits « sur le plat ». L'observation détaillée a été rapportée par ailleurs (1). On sait maintenant que cette *Salmonella* aviaire peut être pathogène pour l'homme (2).

S. bovis morbificans a été responsable, dans 1 cas, de manifestations cliniques sévères d'allure typhoïdique. G. Stable et G. Philpott Iris (3) ont décrit une grave épidémie de gastro-entérite infantile survenue en Australie et due à ce même germe. Dans un autre cas, nous avons isolé *S. bovis morbificans* chez un porteur de germes sain qui semble s'être contaminé trente ans auparavant, durant la guerre 1914-1918.

S. newport n'a été trouvée qu'une fois.

S. paratyphi A variété *durazzo* existait dans les selles d'un porteur de germes sain, employé dans une industrie alimentaire. Ce sujet est responsable d'un certain nombre de cas d'intoxication alimentaire qu'il nous a été malheureusement impossible d'étudier complètement. La souche isolée possédait le seul antigène somatique II à l'état pur. Il est remarquable que nous n'ayons jamais isolé dans le Nord de la France de souche de *S. paratyphi* A typique possédant les antigènes I et II.

S. ballerup a été isolée chez un malade présentant des troubles colitiques. On sait que *S. ballerup* ne fait plus partie du genre *Salmonella*. Nous la signalons cependant ici. La souche isolée qui possède l'antigène Vi nous sert maintenant pour la recherche des bactériophages Vi dans les eaux.

Il est remarquable de noter que nous n'avons pas trouvé de *S. cholerae suis* dans nos coprocultures. Sohier et Jaulmes ont attiré l'atten-

(1) Ch. GERNEZ-RIEUX, R. BUTTIAUX, A. KESTELOOT et R. SUFFRAN, *Presse Méd.*, 1949, p. 479.

(2) P. R. EDWARDS, D. W. BRUNER et A. B. MORAN, *J. Inf. Dis.*, 1948, 83, 220

(3) G. STABLE et G. PHILPOTT IRIS, *Med. J. Austral.*, 1948, 2, 63.

tion sur l'importance de ce germe, en France (4) ; Seligman, Saphra et Wassermann (5), Edwards, Bruner et Moran (2) viennent, en 1946 et 1948, de signaler son rôle dans les salmonelloses aux U. S. A. Notre région du Nord semble en être exempté jusqu'à présent. Nous l'avons cependant isolée dans un pus d'abcès osseux et dans un liquide pleural de deux malades de nationalité étrangère. Les deux fois il s'agissait de *S. cholerae suis*, variété *kunzendorf*.

De même, nous avons trouvé *S. typhi murium* dans un pus d'abcès ganglionnaire ayant l'aspect clinique d'un abcès froid.

Ces résultats montrent l'importance des salmonelloses et la variété des *Salmonella* trouvées dans la région du Nord de notre pays. Il s'agit, en France, d'un problème d'hygiène publique. La très importante épidémie de fièvre paratyphoïde B de 1949 en est une démonstration préemptoire. Ils posent des problèmes d'organisation biologique et épidémiologique sur lesquels nous reviendrons par ailleurs.

(Instituts Pasteur de Paris et de Lille.)

L'ISOLEMENT DE L'ACHORION SCHONLEINI EN GRÈCE SUR LE MILIEU NUTRITIF DE SABOURAUD MODIFIÉ

Par THÉODORE G. STAVRIANOPoulos.

Les avis contradictoires, émis par les divers auteurs quant au nombre des achorions d'origine humaine, nous ont incité à assayer d'établir quel est l'*Achorion* qui se rencontre habituellement, et s'il existe à la fois plusieurs variétés d'*Achorion schönleini*, ou d'autres *Achorion* d'origine humaine. Notre contribution dans ce domaine a été, ainsi que le prouvent nos expériences, la modification du milieu de Sabouraud et l'isolement en cultures pures et typiques, pour la première fois en Grèce, de l'*Achorion schönleini*, au Laboratoire microbiologique de l'hôpital André Syggros.

En utilisant d'abord le milieu de Sabouraud, nous n'avons pu obtenir de cultures pures, car à un stade de développement de la culture, et même vers les cinquième et sixième jours, celle-ci était recouverte très abondamment par un *Penicillium*. Louste et Glere ayant observé que le favus se développe très facilement chez les sujets atteints de diabète sucré, nous avons été amené à utiliser le sérum sanguin de ces sujets en l'ajoutant au milieu de Sabouraud comme un élément probablement favorable au développement du champignon.

En utilisant du sérum sanguin de diabétique de 3 ou 4 p. 100 de glucose (2 cm³ par tube de milieu de Sabouraud), nous avons obtenu un nouveau milieu qui nous a donné des résultats très satisfaisants.

Nos expériences faites sur 58 cas de favus humain de toutes formes et de toutes localisations [favus des régions pileuses, favus urcéolaire, favus scutiforme, favus pityriasique, favus impétigineux, favus des

(4) R. SOHIER et JAULMES, *Presse Méd.*, 1943, p. 10.

(5) E. SELIGMAN, I. SAPHRA et M. WASSERMANN, *J. Immunol.*, 1946, 54, 69.

régions glabres (forme « herpeticus »), favus des ongles] sur ce milieu nous ont donné des cultures pures et typiques dans une proportion de 87 p. 100.

A partir de ces cultures, nous avons ensuite obtenu, par transplantations successives, des formes intermédiaires et duveteuses qui diffèrent essentiellement des primitives, en volume, en finesse des circonvolutions, en vitesse de développement, et en couleur. Dans les cultures, le champignon présenta une grande variété morphologique, ainsi que l'a décrit en détail Sabouraud.

Conclusions. — a) Toutes les formes de favus, du cuir chevelu, de la peau glabre et des ongles sont dues exclusivement à l'*Achorion schönleinii*.

b) L'aspect différent des lésions que nous avons très souvent observé chez l'homme, surtout entre les lésions du cuir chevelu et celles de la peau glabre, est dû, à notre avis, aux conditions locales dans lesquelles se développe le champignon et à d'autres facteurs jusqu'à présent mal connus.

Par conséquent, il n'existe pas deux variétés de ce genre provoquant l'une le favus à godets, l'autre le favus en cercles.

c) Aucune autre espèce, identique ou non à celles qui ont été décrites par différents auteurs, n'a été isolée.

(*Laboratoire Microbiologique de l'Hôpital « André Syggros » d'Athènes.*)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Quelques observations sur la microflore des eaux et des sédiments oligocènes du Bassin de Manosque (Basses-Alpes), par M^{me} H. WINOGRADSKY.

Accumulation des substances dissoutes par les corps microbiens. Etude quantitative par polarographie. I. Fixation du bleu de méthylène, par A. KEPES.

ERRATUM

Communication J. Blass, M. Macheboeuf, P. Springell et F. Tayeau : « Devenir des cénapses lipoprotéiques au cours de l'hydrolyse enzymatique des protéines du sérum sanguin » : Ces *Annales*, novembre 1949, 77, 588, première ligne :

Au lieu de : L'un de nous [4]....

Lire : L'un de nous [3]....

Le Gérant : G. MASSON.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

EXTRAIT DES STATUTS :

Article premier. — L'association dite Association des Microbiologistes de Langue Française, fondée en 1937, à Paris, a pour but de grouper les Microbiologistes de langue française et de créer entre eux un lien. Elle a son siège à Paris.

L'association se compose de membres nationaux et de membres étrangers de toutes langues.

La langue française est la langue officielle des Congrès de l'Association et celle de la publication de ses travaux.

Art. 2. — L'A. M. L. F. est instituée uniquement pour l'étude et la discussion en commun de toutes les disciplines relevant de la science microbiologique.

Art. 3. — Les membres nationaux de l'A. M. L. F., ainsi que les membres étrangers résidant habituellement en France constituent la Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIETE FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. La Section française de l'A. M. L. F. reçoit dans l'intervalle des Congrès une délégation permanente du Conseil de l'A. M. L. F. Son activité est régie par un règlement intérieur, approuvé par l'Assemblée Générale.

Art. 4. — La Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIETE FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE, constitue de plein droit la Section française de l'Association internationale de Microbiologie.

Art. 5. — Peut faire partie de l'Association toute personne remplissant une fonction scientifique dans un laboratoire de microbiologie (microbiologie pure ou appliquée, bactériologie, pathologie infectieuse, immunologie, sérologie, chimiothérapie, cancérologie), ou ayant publié des travaux scientifiques de microbiologie.

Art. 23. — Publications — Les publications des travaux exposés dans les séances mensuelles se font dans les conditions et selon les modalités décidées par le Bureau de la Section française.

Le Bureau peut refuser de publier tout travail ou communication, qui ne serait pas conforme aux buts de l'association ou au caractère de ses publications. Ses décisions sont sans recours.

Art. 27. — Les auteurs des communications et démonstrations devront être membres de l'Association. Les étrangers à l'Association ne seront acceptés comme auteurs que s'ils ont pour co-signataire un membre de l'Association, ou s'ils ont été invités par le Bureau à faire une communication, ou si un membre de l'Association ayant assisté aux recherches rapportées se charge de discuter le travail en séance.

En dehors des Congrès, dont la périodicité et la date sont fixées par l'Assemblée Générale sur la proposition du Bureau, l'Association se réunit en séances consacrées à des communications scientifiques, *le premier jeudi de chaque mois* (août et septembre exceptés), à 16 heures. Les séances ont lieu au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur ; elles sont publiques.

Les membres désirant présenter des communications sont priés d'en aviser le Secrétaire général, et de lui en communiquer le titre, pour permettre l'établissement de l'ordre du jour de la réunion.

Le texte des communications doit être remis à la séance, établi *varietur*, en exemplaire dactylographié original. La bibliographie

des auteurs cités sera établie, conformément aux règles admises par l'Association Internationale de Microbiologie, dans l'ordre suivant : nom de l'auteur, titre du périodique (en abrégé et en italiques), année de publication, tome (en chiffres arabes gras), page. Les signes t., p., etc., sont supprimés. Les abréviations des noms de périodiques courants figurent sur une liste qui sera adressée aux auteurs, sur leur demande. Les figures illustrant le texte doivent être remises avec leurs clichés typographiques, sinon il pourra en résulter des délais de publication. La Rédaction se charge, le cas échéant, de faire faire tous les dessins, graphiques, tracés, et de faire clicheter, aux frais des auteurs, tous les documents qui lui seront adressés à temps, soit huit jours au moins avant la séance, pour parution dans le numéro suivant des *Annales de l'Institut Pasteur*.

En raison des restrictions apportées aux publications par les circonstances actuelles, le texte de chaque communication ne pourra occuper plus de deux pages de l'emplacement réservé dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, soit environ 1.200 mots. Les références bibliographiques et les clichés, s'il y en a, seront compris dans cet espace. Toute communication dépassant ce maximum sera retournée à son auteur, ou devra avoir été préalablement acceptée par la Rédaction des *Annales de l'Institut Pasteur*, pour y paraître en Mémoire.

Le Secrétaire général : P. LÉPINE.

Séance du 3 Novembre 1949.

	SOMMAIRE	Pages
Communications :		
Recherches sur l'hémolysine de <i>Cl. sordellii</i> ; par A.-R. PREVOT et J. MALGRAS	133	
Comparaison entre l'extraction du virus de la mosaïque du Tabac par voie mécanique et sous l'action des enzymes du tube digestif de l'Escargot, par P. LIMASSET, P. CORNUET et Y. GENDRON.	133	
Effet sur l'accroissement d'une tumeur expérimentale du rat blanc souche T8 de Guérin de l'administration par voie buccale d'un complexe ferricosique de l'acide tartrique, par A. MOREL, A. JOSSEURAND, J. VIALLIER et J. C. KALB.	138	
Recherches sur le mode d'activité des sulfones. — II. Étude analytique, par F. BOYER, M ^{me} J. TROESTLER, N. RIST et J. TABONE.	140	
Antibiotiques et lyse bactériophagique. — IV. Étude, au microbiophotomètre, de l'action conjuguée du bactériophage et de la streptomycine sur la culture d'un staphylocoque blanc, par EWALD EDLINGER et MICHEL FAGUET.	144	
Un nouveau type antigénique de <i>Shigella boydii</i> , par S. SZTURM, D. et M. PIÉCHAUD et R. NÉEL.	146	
Les Salmonelloses dans le Nord de la France, par R. BUTTIAUX, L. LE MINOR et A. KESTELOOT.	147	
L'isolement de l' <i>Achorion schöneleini</i> en Grèce, sur le milieu nutritif de Sabouraud modifié par THEODORE STAVRIANOPoulos.	149	

FEB 20 1950

CHESAPEAKE MFG. CO.
CONSOLIDATED PLANT

Dépot légal. — 1950. — 1^{er} Trimestre. — Numéro d'ordre 1136. — Masson et C^{ie}, édit., P
Imprimé par l'Ancre Impie de la Cour d'Appel, 1, rue Cassette, à Paris (France)
Published in France.